

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la actividad de diferentes B-lactámicos frente a fenotipos de
resistencia de *Haemophilus influenzae* en un modelo
farmacodinámico *in vitro*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Natalia González Hidalgo

Directores

José Prieto Prieto
María Luisa Gómez-Lus Centelles

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE DIFERENTES
B-LACTÁMICOS FRENTE A FENOTIPOS DE
RESISTENCIA DE *Haemophilus influenzae* EN UN
MODELO FARMACODINÁMICO *in vitro***

TESIS DOCTORAL

NATALIA GONZÁLEZ HIDALGO

Madrid, 2014



Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

28040 Madrid

José Prieto Prieto, Catedrático del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y M^a Luisa Gómez-Lus Centelles, Profesora Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada: “**Estudio de la actividad de diferentes β -lactámicos frente a fenotipos de resistencia de *Haemophilus influenzae* en un modelo farmacodinámico *in vitro***”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por Dña. Natalia González Hidalgo en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la UCM. Estimando que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense, se solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Madrid, a 12 de mayo de 2014

Prof. Dr. José Prieto Prieto

Prof. Dra. M^a Luisa Gómez-Lus Centelles

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a que esta tesis viera la luz.

En primer lugar, a mis directores de tesis, el Profesor Doctor José Prieto Prieto y la Profesora Doctora M^a Luisa Gómez-Lus Centelles por brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo y por su dedicación en el desarrollo de este proyecto.

Al Doctor Luis Alou y a David Sevillano, por su indispensable ayuda y porque sin ellos habría sido imposible llevar a cabo este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, con los que tantas horas he pasado: Almudena (por estar siempre ahí), Olatz (por los comienzos), Martha (por el codo con codo), Fabio (por sus consejos moleculares), Maite, Beatriz, Carmen R, Pilar E, Sandra, Laura, Pilar T, Pedro y Agustina. Gracias por los buenos momentos.

A mi gran familia, los que están y los que marcharon. En especial a mis hermanos y sobrino, y sobre todo a mi madre, que siempre ha sido el punto de apoyo que mueve mi mundo.

A Vicen, por su amor y generosidad.

Y por último a mis amigos, y en especial a Josete por su apoyo incondicional.

A mi madre

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. <i>Haemophilus influenzae</i>	9
1.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	9
1.2. PATOGENIA	11
1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS	11
1.3.1. Producción de β -lactamasas	12
1.3.2. Modificación de las PBPs	13
1.3.3. Genotipos/Fenotipos	16
1.4. CUADRO CLÍNICO	18
1.5. EPIDEMIOLOGÍA	23
2. OTROS PATÓGENOS IMPORTANTES DEL TRACTO RESPIRATORIO	26
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	26
2.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	27
3. ECOLOGÍA BACTERIANA Y COPATOGENICIDAD	28
4. FARMACOLOGÍA	31
4.1. FARMACOCINÉTICA	32
4.2. FARMACODINÁMICA	35
4.3. PATRONES DE ACTIVIDAD BACTERICIDA	35
4.4. MODELO FARMACOCINÉTICO <i>in vitro</i>	38
5. β -LACTÁMICOS	38
5.1. PENICILINAS	41
5.2. CEFALOSPORINAS	42

5.3. β -LACTÁMICOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO	44
5.3.1. Amoxicilina	44
5.3.2. Amoxicilina/ácido clavulánico	45
5.3.3. Cefuroxima	47
5.3.4. Cefditoren	47
OBJETIVOS	49
MATERIAL y MÉTODOS	55
1. CEPAS	57
2. MEDIOS DE CULTIVO Y ESTUDIOS PRELIMINARES	58
3. ANTIMICROBIANOS	60
4. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD	60
5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β -LACTAMASA	62
6. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE <i>H. influenzae</i>	63
6.1. EXTRACCIÓN DE ADN	63
6.2. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN	63
6.3. CEBADORES UTILIZADOS	64
6.4. DETECCIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE	65
AMPLIFICACIÓN	
6.5. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS	65
7. MODELO FARMACOCINÉTICO <i>in vitro</i>	66
8. REGÍMENES TERAPEÚTICOS SIMULADOS	70

9. CURVAS DE MUERTE BACTERIANA	72
10. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO	74
11. ANÁLISIS DE DATOS	75
11.1 ANÁLISIS DE LA FARMACOCINÉTICA	75
11.2. VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIBIÓTICO	76
RESULTADOS	77
1. ESTUDIO 1	79
1.1. FARMACOCINÉTICA	79
1.2. SENSIBILIDAD <i>in vitro</i>	80
1.3. FARMACODINÁMICA	82
1.4. SIMULACIONES FARMACODINÁMICAS	82
1.5. ACTIVIDAD β -LACTAMASA	86
2. ESTUDIO 2	88
2.1. FARMACOCINÉTICA	88
2.1.1. AMC VS. BLNAS Y BLNAR Y CEFDITOREN	88
2.1.2. CEPA BLPACR	91
2.2. SENSIBILIDAD <i>in vitro</i>	93
2.3. FARMACODINÁMICA	93
2.4. SIMULACIONES FARMACODINÁMICAS	94
2.5. ACTIVIDAD β -LACTAMASA	98
3. ESTUDIO 3	100
3.1. FARMACOCINÉTICA	100
3.2. SENSIBILIDAD <i>in vitro</i>	104

3.3. FARMACODINÁMICA	104
3.4. FITNESS EN LAS SIMULACIONES LIBRES DE ANTIBIÓTICO	106
3.5. SIMULACIONES CON ANTIBIÓTICO E INÓCULO MIXTO	108
3.6. ACTIVIDAD β -LACTAMASA	112
DISCUSIÓN	115
1. ESTUDIO 1	121
2. ESTUDIO 2	126
3. ESTUDIO 3	131
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	143
SUMMARY	177

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
AMC	Amoxicilina/ácido clavulánico
AML	Amoxicilina
Arg	Arginina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Asn	Asparagina
BLNAS	Beta-Lactamasa Negativo Ampicilina Sensible
BLPAR	Beta-Lactamasa Positivo Ampicilina Resistente
BLNAR	Beta-Lactamasa Negativo Ampicilina Resistente
BLPACR	Beta-Lactamasa Negativo Amoxicilina/ácido clavulánico Resistente
BSAC	<i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</i>
Cc	Compartimento central
CDN	Cefditoren
CXM	Cefuroxima
CI	Aclaramiento
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
C_{max}	Concentración máxima
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI₅₀	CMI para el 50% de la población
CMI₉₀	CMI para el 90% de la población
DE	Desviación estándar

dNTP	Dinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FC	Farmacocinética
FD	Farmacodinámica
GABHS	Estreptococo beta-hemolítico del grupo A
gBLNAR	BLNAR caracterizado genotípicamente
h	Hora
His	Histidina
HTM	<i>Haemophilus Test Medium</i>
I	Intermedio
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
Ile	Isoleucina
KTG	Lisina-Treonina-Glicina
Leu	Leucina
Log₁₀	Logaritmo decimal
LP	Liberación prolongada
Lys	Lisina
M	Molar
Met	Metionina
ml	mililitro
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	N-acetilglutámico
Nm	Nanómetro

PBP	Proteína de unión a penicilina
PRSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a penicilina
Phe	Fenilalanina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
R	Resistente
S	Sensible
SAUCE	Sensibilidad de los antimicrobianos utilizados en la comunidad en España
Ser	Serina
SSN	Serina-Serina-Asparagina
T_{1/2}	Vida media
T_{>CMI}	Tiempo sobre la CMI
Thr	Treonina
T_{max}	Tiempo en el que se alcanza la C _{max}
THS	Todd-Hewitt suplementado
UFC	Unidades formadoras de colonias
Val	Valina
Vd	Volumen de distribución
Vs	Volumen suplementario
µg	Microgramos
µl	Microlitros

Introducción

1. *Haemophilus influenzae*

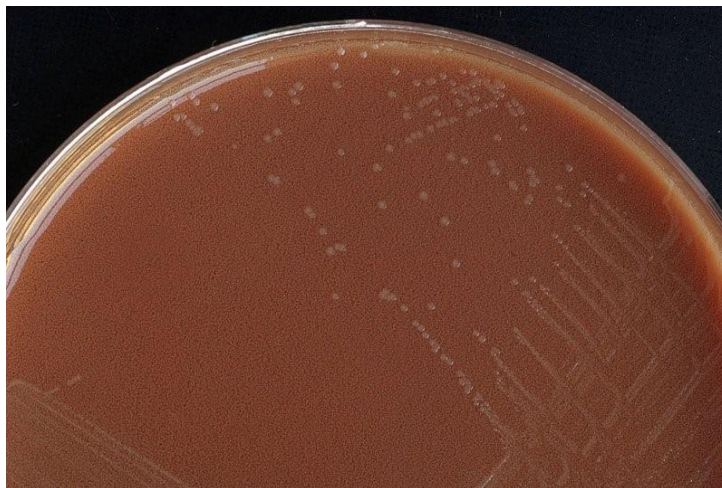
1.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Haemophilus influenzae, denominado inicialmente como bacilo de Pfeiffer, fue descrito por el médico alemán Emil Pfeiffer en el año 1892, quien llegó a la conclusión errónea de que esta bacteria era la causante de la pandemia gripal presente en aquella época. Décadas más tarde comenzó a hacerse evidente la verdadera imagen acerca de la actividad patogénica de este microorganismo, y tras observarse que formaba parte de la flora normal del tracto respiratorio superior, en el año 1931 Margaret Pittman demostró la existencia de dos tipos de cepas: capsuladas y no capsuladas, identificando los 6 serotipos (a-f) de las cepas capsuladas (Pittman M, 1931). Dos años más tarde, Smith *et al.* descubrieron que la gripe presentaba una etiología vírica, descartándose cualquier asociación confusa entre esta enfermedad y *H. influenzae* (Smith *et al.*, 1933).

El género *Haemophilus* está formado por cocobacilos gramnegativos con un marcado pleomorfismo, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos y no esporulados. El nombre genérico de *Haemophilus* se debe a que esta bacteria necesita ciertos factores de crecimiento para su desarrollo que se encuentran en los hematíes. *H. influenzae* es, por tanto, una bacteria exigente que requiere medios complejos para su crecimiento; además de los componentes habituales de los medios de cultivo enriquecidos, necesita la adición del factor X (hemina, “X” por desconocido) y el factor V (nicotinamida adenina dinucleótido o NAD⁺, “V” por vitamina) (Murphy TF, 2006; Rodríguez-Avial C *et al.*, 1996). Las colonias suelen presentar una forma granular, transparente o ligeramente opaca, circular, en cúpula y alcanzan un tamaño

de 0,5-0,8 mm durante las primeras 24 horas de crecimiento (Murphy TF, 2006) (ver Figura 1).

Figura 1. Crecimiento de *H. influenzae* en placa de agar chocolate.



La estructura de la pared celular de *Haemophilus* es la típica de los gramnegativos con un lipopolisacárido con actividad endotoxina, mientras que en la membrana externa están presentes las proteínas específicas de especie y cepa. Como se ha comentado anteriormente, *H. influenzae* puede presentar cápsula polisacáridica, clasificándose como no capsulado (no tipable) o capsulado (tipable), determinándose seis serotipos antigénicos (a-f) (Pittman M, 1933). Antes de la introducción de la vacuna frente a *H. influenzae* tipo b (Hib), este serotipo era el responsable de más del 95% de las infecciones invasivas causadas por *H. influenzae*. Tras la vacunación, han desaparecido la mayoría de las enfermedades causadas por dicho serotipo, mostrándose actualmente como serotipos más frecuentes los no encapsulados, y en menor proporción el c y f (Murray PR *et al*, 2006).

1.2. PATOGENIA

H. influenzae es un patógeno oportunista exclusivamente humano que tiene su nicho ecológico en la mucosa nasofaríngea y que se propaga de individuo a otro mediante gotitas transmitidas por el aire o por contacto directo con las secreciones. En la mayoría de casos, la bacteria persiste sin causar síntomas dando lugar al estado de portador; pero cuando el microorganismo es capaz de traspasar la barrera epitelial y pasar a la sangre, puede dar lugar a una bacteriemia que a su vez puede diseminarse a otras localizaciones produciendo meningitis, epiglotitis y otras infecciones sistémicas (Murphy TF, 2006; Rodríguez-Avial C *et al*, 1996). Estas enfermedades presentan un carácter agudo y grave, y generalmente son producidas por cepas capsuladas (principalmente Hib) (Campos J). La cápsula polisacáridica supone el principal factor de virulencia, ya que actúa impidiendo la fagocitosis, la desecación y la acción de algunas enzimas como las lisozimas, proporcionándole capacidad invasiva (Rodríguez-Avial C *et al*, 1996). En otras ocasiones, la colonización es seguida de una difusión por contigüidad dentro del tracto respiratorio dando lugar a infecciones localizadas como otitis media, sinusitis y conjuntivitis (Rodríguez-Avial C *et al*, 1996). Éstas son menos graves, más frecuentes, y generalmente son producidas por cepas no capsuladas (Campos J).

1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS

El tratamiento de las infecciones causadas por *H. influenzae* puede verse seriamente afectado por la resistencia de este microorganismo frente a determinados

antimicrobianos, siendo los antibióticos β -lactámicos el tratamiento de primera línea frente a estas infecciones. La disminución de la sensibilidad a estos antibióticos ha supuesto un problema desde principios de los años 70, cuando aparecieron las primeras cepas productoras de β -lactamasas (De Groot R *et al*, 1991; Jorgensen JH, 1992). Además, a este mecanismo de resistencia hay que añadir la aparición, a finales de esta década, de cepas que presentaban cambios en las proteínas fijadoras de penicilina o PBPs (del inglés, *Penicillin Binding Proteins*) (Markowitz SM, 1980; Parr TR Jr & Bryan LE, 1984).

1.3.1. Producción de β -lactamasas

La producción de β -lactamasas es el mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos más habitual entre las cepas de *H. influenzae*. Se han identificado dos tipos β -lactamasas en este microorganismo, TEM-1 y ROB-1; ambas serán β -lactamasas de clase A mediadas por plásmidos (Bush K *et al*, 1995; Farrel DJ *et al*, 2005). Estas enzimas actúan rompiendo el enlace amídico del anillo β -lactámico tras unirse al grupo carboxilo, impidiendo así la unión a las PBPs y volviendo ineficaces estos antibióticos (Bush K, 1988). La producción de β -lactamasas fue detectada por primera vez en 1972, y ya en 1975 se identificó el tipo de β -lactamasa TEM-1, codificada por el gen *bla*TEM-1A o *bla*TEM-1B (Medeiros AA & O'Brien TF, 1975). En 1981 se descubrieron las β -lactamasas ROB-1 (Rubin L *et al*, 1981) codificadas por el gen *bla*ROB. Ambas enzimas presentan un perfil similar de sustratos, confiriendo a la bacteria resistencia a ampicilina y capacidad para hidrolizar la

nitrocefina. Además, son inhibidas con eficacia por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, por lo que conservan su sensibilidad a la combinación amoxicilina/ácido clavulánico (Bush K *et al*, 1995; Farrell DJ *et al*, 2005).

Para detectar estas β -lactamasas actualmente se utiliza el método de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (Farrell DJ *et al*, 2005; Hasegawa K *et al*, 2003; Tristram SG & Nichols S, 2006). La β -lactamasa TEM-1 presenta una prevalencia mucho mayor; como se muestra en un estudio global realizado por Farrell *et al* en el que se detectaron un 93,7% de cepas que presentaban la enzima TEM-1 frente a un 4,6% que presentaban la ROB-1 (Farrell DJ *et al*, 2005). Esta prevalencia varía en función del área geográfica, siendo raro encontrar cepas que presenten ambas β -lactamasas.

1.3.2. Modificación de las PBPs

Las PBPs se encuentran en la membrana celular e intervienen en la síntesis de la pared bacteriana llevando a cabo la última etapa de la síntesis de peptidoglucano mediante una reacción de transpeptidación. *H. influenzae* posee 8 PBPs: 1A, 1B, 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6 (Mendelman PM *et al*, 1990). Estas proteínas presentan tres motivos altamente conservados esenciales para su función, que en el caso de la PBP3 son el S327-T-V-K, el S379-S-N y el K513-T-G (Ubukata K *et al*, 2001). Los antibióticos β -lactámicos se unen covalentemente a estas proteínas inactivándolas, y se ha observado que algunas de las mutaciones producidas en el gen *ftsI* que codifica la PBP3 tienen

como consecuencia una disminución de la afinidad por estos antibióticos (Clairoux N *et al*, 1992).

La primera cepa de *H. influenzae* con modificaciones en la PBP3 fue aislada en Nueva Zelanda durante los años 1978-1980 (Markowitz SM, 1980; Parr TR Jr & Bryan LE, 1984). En el año 2001 Ubukata *et al* caracterizaron las mutaciones en el gen *ftsI* que dan lugar a los cambios conformacionales de la PBP3 (Ubukata K *et al*, 2001). Las secuencias de aminoácidos de este gen muestran varias sustituciones que se repiten en las diferentes cepas analizadas, lo que les permitió clasificarlas en 3 grupos. En el grupo I la Arg situada en la posición 517 (cercana al motivo KTG) es sustituida por una His; en el grupo II la Asn situada en la posición 526 es sustituida por una Lys; y en el grupo III, en adición a la sustitución en la posición 526, los residuos Met-377, Ser-385 y Leu-389 (ceranos al motivo SSN) son sustituidos por Ile, Thr y Phe, respectivamente. Al año siguiente, de acuerdo a esta caracterización, Dabernat *et al* dividieron el grupo II en 4 subgrupos (Dabernat H *et al*, 2002). De este modo, las cepas BLNAR quedaron clasificadas en 6 grupos: I, IIa, IIb, IIc, IId, y III. Todos estos subgrupos presentan la sustitución en la posición 526 en adición a otras mutaciones. El subgrupo IIa abarca las cepas que presentan la mutación en la posición 526 pudiendo mostrar más sustituciones sin que sea en la posición 502. Los subgrupos IIb y IIc se caracterizan por presentar la sustitución en la Ala posición 502 por Val o Thr, respectivamente. Y por último, el subgrupo IId muestra la sustitución de una Ile en la posición 449 por una Val. En la Tabla 1 se muestran las sustituciones aminoacídicas que conforman cada uno de los grupos en base a estos dos autores.

Tabla 1. Grupos establecidos en base a las sustituciones en el gen *fisI*.

Grupo	Sustitución en el aa	Sustitución por el aa	Nomenclatura
I	Arg 517 (cercano al motivo KTG)	His 517	R517H
	Otros aa	Otros aa	Otros aa
IIa	Asn 526	Lys 526	N526K
IIb	Asn 526	Lys 526	N526K
	Ala 502	Val 502	A502V
	Otros aa	Otros aa	Otros aa
IIc	Asn 526	Lys 526	N526K
	Ala 502	Thr 502	A502T
	Otros aa	Otros aa	Otros aa
IId	Asn 526	Lys 526	N526K
	Ile 449	Val 449	A502V
			Otros aa
III	Asn 526	Lys 526	N526K
	Met 377(cercano al motivo SSN)	Ile 377	M377I
	Ser 385(cercano al motivo SSN)	Thr 385	S385T
	Leu 389(cercano al motivo SSN)	Phe 389	L389F
	Otros aa	Otros aa	Otros aa

aa: aminoácido, Ala: alanina, Arg: arginina, Asn: asparagina, His: histidina, hIle: isoleucina, Leu: leucina, Lys: lisina, Met: metionina, Phe: fenilalanina, Ser: serina, Thr: treonina, Val: valina, KTG: lisina-treonina-glicina, SSN: serina-serina-asparagina.

En función de las mutaciones que se producen en la PBP3 los niveles de resistencia a β -lactámicos varían. Los aislados con resistencia intermedia ampicilina normalmente presentan las mutaciones R517H o N526K (grupos I y II, respectivamente), mientras que los pertenecientes al grupo III se asocian con niveles de resistencia a ampicilina más elevados (Ubukata K *et al* 2001; Hasegawa K *et al*, 2003). Mediante mutagénesis dirigida y posterior recombinación, se ha observado que la mutación puntual N526K incrementa al doble la concentración mínima inhibitoria (CMI) a ampicilina y 2-8 veces la CMI a varias cefalosporinas. Del mismo modo, se observó que las sustituciones S385T y /o L389F en adición a la N526K (grupo III)

producen un incremento adicional de la CMI a cefalosporinas de 2-4 veces (Osaki Y *et al*, 2005).

Kaczmarek *et al* afirmaron que las cepas que presentaban mutaciones en las PBPs y una elevada CMI a ampicilina (≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) combinaban este mecanismo de resistencia con el de la bomba de expulsión AcrAB (mutaciones en el gen *acrR*, que codifica el represor del gen *AcrAB*, dan lugar a una sobreexpresión de la bomba de expulsión), aunque éste último mecanismo por sí solo no resultó capaz de generar resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Kaczmarek FS *et al*, 2004). Sin embargo, no se ha detectado en estudios posteriores dicha asociación (García-Cobos S *et al*, 2007; Sevillano D *et al*, 2009).

1.3.3. Genotipos/Fenotipos

En base a la presencia/ausencia de los mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos anteriormente explicados, producción de β -lactamasas y/o modificación de las PBPs, y/o el valor de la CMI a ampicilina se han definido cuatro genotipos/fenotipos diferentes.

- **BLNAS** (β -Lactamasa Negativo Ampicilina Sensible): son cepas que no presentan un mecanismo de resistencia a β -lactámicos detectable (no producen β -lactamasas ni presentan modificaciones en las PBPs) y son sensibles a ampicilina (S: CMI ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$) según los puntos de corte propuestos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

- **BLPAR** (β -Lactamasa Positivo Ampicilina Resistente): son cepas productoras de β -lactamasas que no presentan modificaciones en las PBPs, resistentes a ampicilina (R: CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) y sensibles a amoxicilina/ácido clavulánico (S: CMI $\leq 4/2$ $\mu\text{g/ml}$).

- **BLNAR** (β -Lactamasa Negativo Ampicilina Resistente): en teoría estas cepas no producen β -lactamasas, presentan modificaciones en las PBPs y son resistentes a ampicilina, pero en la práctica existen dificultades para definir las con precisión. Fenotípicamente, el CLSI las define como cepas no productoras de β -lactamasas resistentes a ampicilina (CLSI, 2014), pero esta descripción es controvertida debido a que existen cepas con valores de CMI < 4 $\mu\text{g/ml}$ que presentan sustituciones en las PBPs. Hasta el momento no existe consenso acerca del punto de corte que debe determinar la resistencia a ampicilina y, por tanto, el fenotipo BLNAR.

Genotípicamente, estas cepas vienen definidas por la presencia de mutaciones en la secuencia del gen *ftsI* que dan lugar a sustituciones aminoacídicas en la PBP3, particularmente cerca de los motivos conservados. De este modo surge otra caracterización mediante el uso del término gBLNAR (“g” de genético), que se emplea para discernir las cepas que presentan mutaciones en el gen *ftsI*, independientemente de la CMI a ampicilina (Hotomi M *et al*, 2007). Se han detectado cepas gBLNAR con valores de CMI de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Hotomi M *et al*, 2007; García-Cobos S *et al*, 2008), por lo que las comparaciones en la prevalencia entre los diferentes estudios puede variar en función de si se definen en base a su valor de CMI a ampicilina o en base a las mutaciones en el gen *ftsI*. Además, algunos autores realizan otra distinción que hace más difícil, si cabe, la categorización de las cepas BLNAR y denominan a las cepas

con CMI a ampicilina ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ que presentan mutaciones en el gen *ftsI* “low BLNAR” por su bajo nivel de resistencia a β -lactámicos y BLNAR a aquellas con valores de CMI superiores (Hasegawa K *et al*, 2006; Skaare D *et al*, 2010).

- **BLPACR** (β -lactamasa Positivo Amoxicilina-Clavulánico Resistente): se definen como cepas productoras de β -lactamasas, que presentan mutaciones en las PBPs y son resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico (R: CMI $\geq 8/4$ $\mu\text{g/ml}$). Estas cepas aparecieron a principios de los años 90, y en aquel entonces se pensó que eran similares a las cepas BLPAR pero con una CMI a amoxicilina/ácido clavulánico más elevada (Doern GV *et al*, 1997). Al igual que con las cepas BLNAR, existe controversia en su definición, ya que la mayoría de estas cepas muestran valores de CMI a amoxicilina/ácido clavulánico inferiores (0,5-2 $\mu\text{g/ml}$) al valor que determina la resistencia.

Cuando se comparan cepas BLPACR y BLNAR que presentan las mismas sustituciones aminoacídicas en la PBP3 se observa que la CMI a ampicilina es mucho mayor para las cepas BLPACR mientras que la sensibilidad frente a amoxicilina/ácido clavulánico y cefalosporinas es similar (Dabernat H *et al*, 2002; Hasegawa K *et al*, 2006; Ubukata K *et al*, 2001; Matic V *et al*, 2003), lo que indica que las β -lactamasas únicamente influyen en la resistencia a ampicilina.

1.4. CUADRO CLÍNICO

H. influenzae es uno de los principales agentes causales de las infecciones respiratorias ocurridas en la comunidad, afectando en su mayoría a niños. En 1988, se

implantó el uso de las primeras vacunas conjugadas frente a Hib y desde entonces, la mayoría de los países occidentales la han incluido en sus programas nacionales de vacunación. En la actualidad, ha disminuido la incidencia y la prevalencia de las enfermedades causadas por este serotipo en los países desarrollados donde los adultos, sobre todo ancianos y personas inmunodeprimidas, pueden verse afectados con mayor frecuencia que los niños (Dworkin MS *et al* 2007; Rubach MP *et al* 2011). Sin embargo, en muchos de los países en vías de desarrollo, donde la vacuna no se emplea rutinariamente, la infección por *H. influenzae* sigue produciendo una morbilidad y mortalidad significativa. En el año 2000 se estimó que el serotipo b era responsable de unos tres millones de enfermedades graves y de unas 386.000 muertes anuales en niños menores de 5 años, que se desencadenaron principalmente en países en vías de desarrollo de África y Asia (WHO, 2005). A continuación se detallan las principales enfermedades causadas por este patógeno oportunista.

- **Meningitis:** Es la manifestación aguda más grave y frecuente de las infecciones sistémicas causadas por *H. influenzae*. La diseminación bacteriana puede ocurrir por vía hematógena o a través del drenaje linfático de la nasofaringe (Musher DM, 1996). Es producida principalmente por cepas del tipo b y supone un problema grave en niños menores de 7 años en aquellas zonas en las que el uso de la vacuna frente a *H. influenzae* no se ha implantado (Tristram SG *et al*, 2007). Con un tratamiento antibiótico adecuado la mortalidad es inferior al 5% (más elevada en países en vías de desarrollo) pero se producen secuelas neurológicas permanentes hasta en un 30-40% de los afectados por esta enfermedad (Murphy TF, 2006).

En aquellas zonas en las que se administra la vacuna, la incidencia de meningitis debida a *H. influenzae* ha disminuido considerablemente (Peltola H, 2000; Thigpen MC *et al*, 2011). El aislamiento de esta bacteria en niños mayores o en adultos es rara, y señala la presencia de otras alteraciones como sinusitis, otitis media, epiglotitis, alcoholismo o traumatismo craneoencefálico, entre otras (Tunkel AR *et al*, 2006).

El tratamiento empírico de la meningitis causada por *H. influenzae* recomendado por la Infectious Disease Society of America (IDSA) es vancomicina más una cefalosporina de amplio espectro como cefotaxima o ceftriaxona. Terapias alternativas frente a *H. influenzae* incluyen cloranfenicol, cefepima y meropenem. Una vez conocido el fenotipo, para las cepas β -lactamasa negativas se recomienda tratar con ampicilina mientras que para las cepas β -lactamasa positivas se debe tratar con una cefalosporina de amplio espectro, empleándose como alternativas cefepima, cloranfenicol o fluoroquinolonas; así como ceftriaxona o cefotaxima en el caso de las cepas β -lactamasa negativas (Tunkel AR *et al*, 2004).

- **Neumonía infantil:** Al igual que en la meningitis, es un patógeno importante en niños entre los 6 meses y los 5 años en aquellas zonas en las que no se emplea la vacuna. En los países en vías de desarrollo supone la principal causa de muerte en niños menores de 5 años (Rudan I *et al*, 2004), estimándose que 1-2 millones de niños fallecen por esta enfermedad (UNICEF/WHO, 2006) y 370.000 de estas muertes son debidas a *H. influenzae* (Watt JP *et al* 2009). Los principales agentes etiológicos son *S. pneumoniae* y Hib (UNICEF/WHO, 2006). La incidencia de la neumonía causada por *H. influenzae* presenta una elevada variabilidad debido a la dificultad para

establecer la etiología, pero se ha estimado que en ausencia de vacuna un 1-3% de los niños pueden presentar un episodio de neumonía por año (Watt JP *et al*, 2009).

En enfermos con neumonía no hospitalizados en los que se sospecha una etiología bacteriana se recomienda tratar empíricamente con amoxicilina, mientras que para pacientes ingresados incluye ampicilina o penicilina G (en inmunocompetentes) y ceftriaxona o cefotaxima (en inmunocomprometidos) para asegurar la eficacia frente a *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina (PRSP) y *H. influenzae* productor de β -lactamasas. Una vez aislado el microorganismo, la terapia dirigida a cepas β -lactamasa negativas incluye ampicilina administrada de forma parenteral o amoxicilina, mientras que para las β -lactamasa positivas se emplea ceftriaxona, cefotaxima, o como forma oral, amoxicilina/ácido clavulánico (Bradley JS *et al*, 2011).

- **Neumonía en adultos:** *H. influenzae* no tipable es el responsable de esta enfermedad en un 2-12% de los casos, presentándose como principales patógenos *S. pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*. Las guías de consenso recomiendan administrar como tratamiento empírico β -lactámicos, macrólidos o quinolonas, elección que depende de si el paciente se encuentra hospitalizado, de si existe comorbilidad y de si se han administrado terapias previas durante los 3 meses anteriores. En la terapia dirigida hacia *H. influenzae* no productor de β -lactamasas ha de utilizarse amoxicilina y, en el caso de que produzcan dicha enzima, cefalosporinas de segunda y tercera generación o amoxicilina/ácido clavulánico. Como terapia alternativa se recomiendan fluoroquinolonas, doxiciclina, azitromicina o claritromicina (Mandell LA *et al*, 2007).

- **Epiglotitis:** Es una enfermedad rara y de extrema gravedad causada principalmente por Hib, aunque a partir de la implantación de la vacuna frente a esta bacteria los estreptococos β -hemolíticos del grupo A (GABHS, del inglés, *Group A β -Hemolytic Streptococcus*), *S. pneumoniae* o *Haemophilus parainfluenzae*, entre otros, han ido adquiriendo mayor importancia, afectando a cualquier grupo de edad (Carey MJ, 1996; Shah RK & Stocks C, 2010). El tratamiento empírico se basa en la administración de cefotaxima, ceftriaxona o ampicilina-sulbactam debido al riesgo de infección por *H. influenzae* resistente a ampicilina (Zoorob M *et al*, 2012).

- **Exacerbación Aguda de la Bronquitis Crónica:** *H. influenzae* es el principal patógeno causante de esta enfermedad, seguido por *S. pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis* (Sethi S *et al*, 2002). El tratamiento empírico se basa en la administración de cefalosporinas de tercera generación, amoxicilina/ácido clavulánico, macrólidos o alguna quinolona; en función de los factores de riesgo que presente el paciente como la comorbilidad y la severidad de la exacerbación (Balter MS *et al*, 2003; Sethi S & Murphy TF, 2004; Álvarez F *et al*, 2002).

- **Otitis Media Aguda:** Es la infección más común en niños, así como la causa más común de prescripción de antibióticos en este grupo de edad (Lieberthal AS *et al*, 2013). Aparece con mayor frecuencia en niños entre los 6 meses y los 5 años, aunque puede darse a cualquier edad (Murphy TF, 2006). *S. pneumoniae* es el principal causante de esta enfermedad seguido de *H. influenzae* no tipable y en menor medida *M. catarrhalis* (Palmu AAI *et al*, 2004). Se produce resolución espontánea en el 50% de los pacientes infectados por *H. influenzae* (Rovers MM *et al*, 2004), pero la Organización Mundial de la Salud estima que se ocasionan 28.000 muertes al año

debido a complicaciones derivadas de esta enfermedad (Acuin J, 2004). El tratamiento empírico es amoxicilina en dosis altas o amoxicilina/ácido clavulánico, empleando como alternativa cefdinir, cefuroxima, ceftriaxona o clindamicina (Lieberthal AS *et al*, 2013).

Otras enfermedades causadas por *H. influenzae* son sinusitis, conjuntivitis, artritis séptica, sepsis neonatal o materna, bacteriemia sin enfermedad localizada, osteomielitis y celulitis (Murphy TF, 2006).

1.5. EPIDEMIOLOGÍA

Al menos el 10% de la carga mundial de morbilidad y mortalidad está relacionada con las infecciones del tracto respiratorio, y aunque la mayoría tiene una etiología vírica, tres cuartas partes del consumo de antibióticos se emplea en tratar estas infecciones (Ball P *et al*, 2002). Para un correcto tratamiento de estas enfermedades es importante conocer la etiología de la enfermedad y observar la evolución de las cepas causantes de la infección. La epidemiología de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos en *H. influenzae* varía geográfica y temporalmente, por lo que es importante tenerla en cuenta al administrar un determinado tratamiento.

La producción de β -lactamasas ha predominado históricamente como el principal mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *H. influenzae*, con una tasa de prevalencia superior al 20% en la mayoría de países occidentales y algunos asiáticos (Fluit AC *et al*, 2005; Lulitanond A *et al* 2012; Kim IS *et al* 2007; Nimmo GR, 2003; Heilmann KP *et al* 2005; Sriver SR *et al*, 1994). Sin embargo, estudios

recientes sugieren que en algunos países de Europa y en Estados Unidos esta prevalencia se está estabilizando o disminuyendo, posiblemente debido al cambio en el patrón de prescripción antibiótica (Pérez-Trallero E *et al*, 2010; García-Cobos S *et al*, 2008; Dabernat H & Delmas C, 2012; Critchley IA *et al*, 2007). En varios estudios de vigilancia a nivel europeo llevados a cabo entre los años 1997-1998, 2002-2003, 2004-2005 y 2006-2007 se ha observado que la resistencia mediada por β -lactamasas ha disminuido de un 19,8%, 23,3% y 16,4% en los tres primeros estudios, respectivamente, hasta 13,6% en el último (Jansen WT *et al*, 2006; Jansen WT *et al* 2008). En España, tras analizar sucesivos estudios de vigilancia a nivel nacional (programa SAUCE, Sensibilidad de Antimicrobianos Utilizados en la Comunidad en España) llevados a cabo entre 1996-1997 (García-Rodríguez JA *et al*, 1999), 1998-1999 (Marco F *et al*, 2001), 2001-2002 (Pérez-Trallero E *et al*, 2005) y 2006-2007 (Pérez-Trallero E *et al*, 2010) se ha observado que la prevalencia de la producción de β -lactamasas ha descendido de un 25,7% en 1996-1997 a un 15,7% en 2006-2007. A nivel nacional, también se observa una disminución de la producción de β -lactamasas en el estudio llevado a cabo por García-Cobos *et al* (García-Cobos S *et al*, 2008) y en un estudio más reciente la tasa de cepas BLPAR fue del 10,5% (Puig C *et al*, 2013), lo que concuerda con los estudios anteriores.

En cambio, el porcentaje de cepas BLNAR y BLPACR está aumentando en algunos países de Europa y Asia (Dabernat H & Delmas C, 2012; García-Cobos S *et al*, 2008; Ito M *et al*, 2010; Park C *et al*, 2013), lo que, a su vez, supone un aumento de la resistencia a amoxicilina. Este hecho tiene importantes implicaciones en el tratamiento de las infecciones respiratorias en la comunidad tanto en adultos como en niños, donde el agente causal no se suele identificar. En Japón, uno de los países con

una tasa más elevada de cepas BLNAR, la tasa de prevalencia oscila en torno al 35-60%, aunque estas cifras pueden variar entre niños y adultos (Sanbongi Y *et al*, 2006; Sakata H *et al*, 2009; Niki Y, 2011; Hoshino T *et al*, 2013). En los estudios a nivel europeo realizados por Jansen WT *et al*, la prevalencia de cepas BLNAR permanece constante en los tres primeros estudios y aumenta en el último (8,8%, 9,6% y 8,8% versus 11,4% en 2006-2007) (Jansen WT *et al*, 2006; Jansen WT *et al* 2008). En España existen datos contradictorios a este respecto: García-Cobos *et al* refieren un aumento de las cepas BLNAR de un 9,3% en 10 años (1997-2007) hasta alcanzar una prevalencia del 27,5% (García-Cobos *et al* 2008), y en el estudio realizado por Puig C *et al* este valor alcanza el 41,1% (Puig C *et al*, 2013); en cambio, en los estudios llevados a cabo en el programa SAUCE se ha observado que la tasa del fenotipo BLNAR ha descendido a lo largo de estos 11 años del 13,5% al 0,7% (Pérez-Trallero *et al*, 2010). Estas diferencias probablemente son debidas a que en los dos primeros estudios mencionados se identifica el genotipo (mediante detección de las mutaciones en la PBP3), mientras que el último se identifica el fenotipo (determinado por el valor de la CMI a ampicilina y la ausencia de producción de β -lactamasas).

Con respecto al fenotipo BLPACR también se observan resultados dispares puesto que en el estudio de García-Cobos *et al* se produjo un descenso de un 13,6% a un 2,8% (García-Cobos S *et al* 2008) y en los estudios del programa SAUCE no fue detectado en el primero, fue de un 0,1% en los dos siguientes y de un 0,3% en el estudio más reciente. A nivel mundial se ha observado que la prevalencia del fenotipo BLPACR es mayor en algunos países como Francia o Corea, alcanzando valores de hasta un 24,6% (Dabernat H & Delmas C, 2012; Park C *et al*, 2013).

2. OTROS PATÓGENOS IMPORTANTES DEL TRACTO RESPIRATORIO

Las bacterias más prevalentes causantes de infecciones respiratorias en la comunidad son *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. *S. pyogenes* es el agente etiológico de la faringoamigdalitis estreptocócica, mientras que *H. influenzae* y *S. pneumoniae* están implicados, con distinta frecuencia, en la otitis media, la neumonía adquirida en la comunidad y la exacerbación aguda de la bronquitis crónica (Fenoll A *et al*, 2006).

2.1. *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae es un frecuente colonizador de la nasofaringe humana causante de otitis, neumonía, septicemia y meningitis en el ser humano (Mufson MA, 2006; Hava DL *et al*, 2003), y tras *H. influenzae*, es uno de los principales responsables de las reagudizaciones bacterianas agudas de la bronquitis crónica (Oteo J *et al*, 2001). Se ha detectado un estado de portador que difiere considerablemente entre niños y adultos, presentando una tasa infantil del 40-70%, mientras que en adultos es inferior al 5% (Raymond J *et al*, 2000; Regev-Yochay G *et al*, 2004). En España, la incidencia de enfermedad invasiva en niños menores de 2 años es de 90 por cada 100.000, aumentado este porcentaje en ancianos y en pacientes inmunocomprometidos (García-Suárez *et al*, 2006).

En este microorganismo la incidencia de los patrones de resistencia antibiótica varía en función de diversos factores como pueden ser la edad del paciente, la muestra

de la que se obtiene y el origen geográfico del aislamiento (García-Rey C *et al*, 2002). Se han observado cambios significativos que complican el tratamiento de las infecciones neumocócicas debido a la aparición de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y otros antimicrobianos. En un estudio de vigilancia reciente realizado a nivel mundial se ha observado que la tasa de prevalencia a penicilina de *S. pneumoniae* oscila entre un 9,3% en Europa y un 25,1% en la cuenca Asia-Pacífico (Darabi A *et al*, 2010). En este sentido, España ha sido uno de los países con porcentajes de resistencia a penicilina más altos en los últimos años, pero recientemente se ha observado un descenso en la prevalencia de la resistencia (Pérez-Trallero E *et al*, 2010).

2.2. *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes es un GABHS que coloniza normalmente la bucofaringe del 15-20% de los niños sanos y adultos jóvenes, y aunque afecta fundamentalmente a niños con edades comprendidas entre los 5 y los 15 años también se encuentra en otros grupos edad (Murray PR *et al*, 2006). Este microorganismo constituye la causa más frecuente de faringitis bacteriana en niños, y aunque no es una enfermedad severa puede ocasionar secuelas inmunológicas que desemboquen en una fiebre reumática o una glomerulonefritis aguda (Cunningham MW, 2000). Otras enfermedades que puede ocasionar son escarlatina, pioderma, erisipela, celulitis, septicemia puerperal, linfangitis o neumonía (Murray PR *et al*, 2006).

Hasta la fecha no se ha constatado la aparición de cepas resistentes o con sensibilidad disminuida a penicilinas, por lo que se emplea este antibiótico como tratamiento de elección frente a la faringitis estreptocócica. A pesar de esto, el porcentaje de fracasos terapéuticos en los tratamientos con penicilina ha pasado de un 10% en 1970 hasta un 30% en la última década (Casey JR, 2007). Como alternativa para estos casos o cuando exista alergia a penicilinas, se recurre al uso de macrólidos o cefalosporinas (Choby BA, 2009).

3. ECOLOGÍA BACTERIANA Y COPATOGENICIDAD

El primer paso para que se produzca una enfermedad bacteriana es la colonización, es decir, el establecimiento de la población en el hospedador. Las condiciones que determinan la capacidad de colonizar un nicho y alcanzar una densidad determinada son fundamentales para determinar la probabilidad de que se produzca enfermedad, la transmisión a otros hospedadores y la presencia de cepas resistentes. Los factores ecológicos que determinan esta colonización son la disponibilidad de nutrientes, el espacio, la presencia de sustancias nocivas y la respuesta inmune del hospedador. La presencia de las poblaciones bacterianas puede alterar estos factores, determinando la posible colonización de una nueva población (Margolis E *et al*, 2010).

H. influenzae, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* son las bacterias más prevalentes en las infecciones del tracto respiratorio adquiridas en la comunidad (Pérez-Trallero E *et al*, 2005). Ser portador de estos aislados depende de múltiples factores como ser

fumador activo o pasivo, el hacinamiento, la edad (Brook I & Gober AE, 2005), la capacidad de adaptación de la cepa (Sá-Leão R *et al*, 2008), las vacunaciones específicas (Hammit LL *et al*, 2006) y la interferencia bacteriana en los nichos libres de antibiótico.

H. influenzae y *S. pneumoniae* se encuentran exclusivamente en humanos y tienen su nicho ecológico en la nasofaringe, observándose una relación sinérgica entre ambos (Margolis M *et al*, 2010; Odutola A *et al*, 2013). Para *H. influenzae*, durante los primeros años de vida, la colonización nasofaríngea es un fenómeno dinámico caracterizado por un constante cambio de una mezcla de clones, con una duración media en su estancia de 1,4-2 meses (Faden H *et al*, 1995; Raymond J *et al*, 2001; Smith-Vaughan HC *et al*, 1996). Durante los 2 primeros años de vida se produce colonización por *H. influenzae* en un 44% de los casos, con una tasa de adquisición más rápida durante el primer año (34%) (Faden H *et al*, 1995). Con el aumento de la edad, la aparición del estado de portador de *H. influenzae* en el tracto respiratorio superior y la cavidad nasal se hace menos frecuente pero en algunos casos puede llegar hasta el 80% (Murthy TF, 2006), observando que un 50% de muestras positivas contienen múltiples cepas (Smith-Vaughan HC *et al*, 1996).

En el caso de *S. pneumoniae*, la tasa de portadores puede alcanzar valores de hasta el 75% (Odutola A *et al*, 2013), con un bajo porcentaje de varias cepas en la misma muestra (Sá-Leão R *et al*, 2002). Mientras que en *H. influenzae* se observa un elevado recambio de cepas (Sá-Leão R *et al*, 2008), el tiempo que permanece en la nasofaringe un PRSP depende de la edad, el cambio de estaciones, que exista en la

familia algún otro miembro portador de PRSP (Ekdahl K *et al*, 1997) y el serotipo, con elevada transmisión del 6A y 14 (Melegaro A *et al*, 2007).

Por último, *S. pyogenes*, un microorganismo ubicuo que frecuentemente coloniza la garganta en personas asintomáticas, presenta tasas de portador del 15-20% en niños (Bisno AL & Stevens D, 2006; Martin JM *et al*, 2004) y 10% en adultos fumadores (Brook I & Gober AE, 2005).

Las superficies mucosas pueden ser colonizadas simultáneamente por múltiples especies, observándose un complicado balance en la orofaringe entre *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y otros microorganismos que forman parte de esta microbiota (Brook I, 2001). Se ha sugerido que esta flora se encuentra alterada en portadores de *S. pyogenes*, con un descenso de otras especies de estreptococos (estreptococos α -hemolíticos) con capacidad de interferir (Brook I, 2001; Brook I & Gober AE, 2006a). Por otro lado, el éxito de un microorganismo en la colonización y quizás en establecer una posible infección, está determinado por su habilidad para competir con otros habitantes de su nicho, mientras que la replicación/supervivencia sirve para ganar espacio y tiempo, lo que permite el predominio frente a otras poblaciones y el éxito (Baquero F, 2005). La dinámica de diferentes poblaciones bacterianas en nichos libres de antibiótico forman la línea base que los tratamientos antibióticos pueden alterar (Cafini F *et al*, 2008; Sevillano D *et al*, 2006).

La existencia de bacterias productoras de β -lactamasas puede tener un papel importante en las infecciones, sean o no causantes de ésta, debido al efecto indirecto sobre la microbiota presente en el nicho causada por la liberación de estas enzimas al medio (Brook I, 2009). La primera evidencia clínica que indica la capacidad de las

bacterias productoras de β -lactamasas para proteger a patógenos sensibles a penicilina fue descrita en 1963 al observarse un incremento en la resistencia a penicilina en GABHS que se inocularon concomitantemente con *Staphylococcus aureus* (Simon HJ & Sakai W, 1963). Dentro de las infecciones del tracto respiratorio superior, este fenómeno se ha estudiado más a fondo en la faringoamigdalitis debida a GABHS. Estos microorganismos se muestran altamente sensibles a la penicilina, pero a pesar de ello se ha informado un aumento de los fracasos en el tratamiento estas enfermedades (Brook I, 1994; Brook I, 2007; Choby BA, 2009; Brook I, 2013). De hecho, se ha demostrado que la presencia de *H. influenzae* no tipable y GABHS está correlacionada (Brook I & Gober AE, 2006b) y que el papel de las bacterias productoras de β -lactamasas está aumentando en las infecciones mixtas, demostrando una elevada rapidez en la aparición en pacientes infectados y su diseminación a otros miembros de la familia (Brook I, 2004).

4. FARMACOLOGÍA

Hasta hace poco tiempo, la elección del antimicrobiano y del régimen posológico frente a un patógeno infeccioso se basaba principalmente en el valor de la sensibilidad del microorganismo a un determinado antimicrobiano (CMI) y en la concentración del fármaco en suero como parámetro farmacocinético (Song JH, 2003; Mueller M *et al* 2004). La CMI, que se define como la concentración mínima de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo, supone una determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana *in vitro* a concentraciones fijas, pero presenta diversas limitaciones debido a que no informa acerca del curso de

la actividad antimicrobiana a lo largo del tiempo, la tasa de muerte bacteriana o la relación dosis-respuesta (Craig WA, 1998; Wright DH *et al*, 2000; Calbo E & Garau J, 2005). Por tanto, el éxito de la terapia antimicrobiana no se basa únicamente en estos valores, sino que además está determinado por las características del fármaco administrado, del hospedador y del agente infeccioso, así como por las complejas interacciones que tienen lugar entre ellos. Debido a esta complejidad, existe una elevada variabilidad en la relación dosis-respuesta que es necesario minimizar (Mueller M *et al*, 2004) mediante el estudio de la farmacocinética (FC) y la farmacodinámica (FD). De este modo, los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antimicrobianos han adquirido un enorme protagonismo, ya que permiten optimizar la eficacia clínica y microbiológica, minimizar la presión selectiva que desencadena el desarrollo de resistencias y determinar un régimen posológico adecuado. Es por ello que, cada vez con mayor insistencia, se buscan nuevas formulaciones que permitan alcanzar y mantener concentraciones plasmáticas más elevadas, un menor número de administraciones diarias y una menor incidencia de efectos adversos.

4.1. FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética se define como el estudio de la relación que se establece entre el antimicrobiano y el paciente, e incluye los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Estos factores, combinados con el régimen de dosificación, determinan el curso del antimicrobiano a lo largo del tiempo o curva concentración-tiempo (Figura 2). El estudio de las características farmacocinéticas

permite determinar la vía de administración, dosificación, así como el ajuste de ambas, según las rutas de eliminación del agente antimicrobiano (Craig WA, 1998; Calbo E & Garau J, 2005; Gómez-Lus ML *et al*, 2008).

Los parámetros farmacocinéticos más relevantes relacionados con la actividad microbiológica de un antibiótico son:

- **Concentración máxima (C_{max}):** máxima concentración obtenida tras la administración de una determinada dosis.

- **Vida media ($T_{1/2}$):** tiempo que tarda en eliminarse un 50% de la dosis administrada.

- **Área bajo la curva (ABC):** área limitada por la curva de concentración de un antibiótico a lo largo del tiempo.

- **Volumen de distribución (V_d):** volumen en el cual la cantidad administrada de fármaco necesitaría estar uniformemente distribuida para que haya una concentración similar.

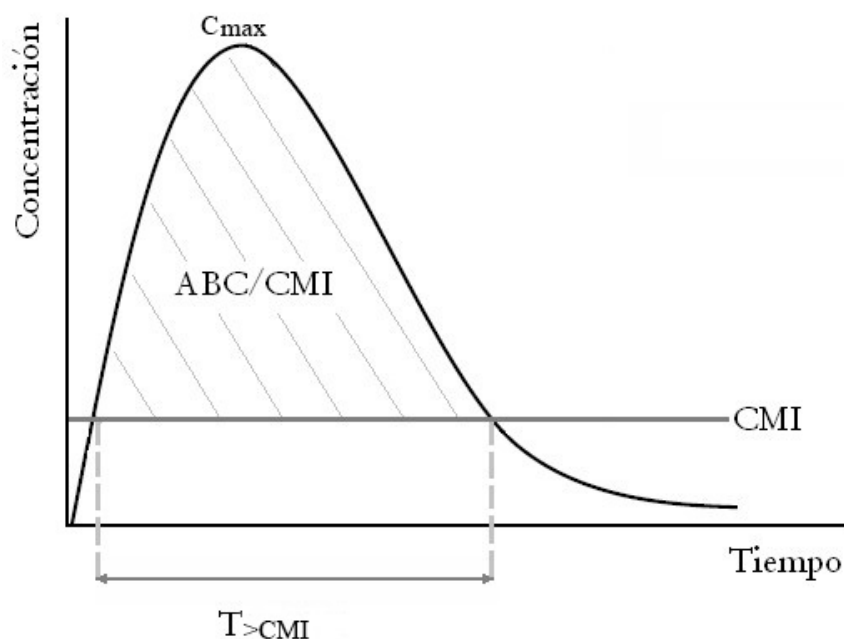
- **Aclaramiento (Cl):** es el resultado de dividir la tasa de eliminación en relación a la concentración plasmática.

- **$T_{>CMI}$:** periodo de tiempo durante el cual la concentración de antimicrobiano excede la CMI.

- **Porcentaje de unión a proteínas plasmáticas:** una vez se ha producido la entrada en el plasma, la mayoría de los fármacos se unen rápidamente a los componentes de la sangre entre los que se incluyen eritrocitos y varias proteínas

plasmáticas como la albúmina (de forma mayoritaria), la α -1-glicoproteína, las lipoproteínas y las γ -globulinas (Kwon Y, 2001; Schmidt S *et al*, 2008). Para los antibióticos, la unión a proteínas parece ser un proceso saturable y reversible (Popick AC *et al*, 1987; Nix DE 2004; Schmidt S *et al*, 2008), y la unión a proteínas se refleja en una disminución de la actividad antimicrobiana, siendo este efecto más pronunciado en antibióticos que presentan una elevada tasa de unión a proteínas (Nix DE *et al*, 2004; Schmidt S *et al*, 2008). Está generalmente asumido que sólo la fracción no unida a proteínas o fracción libre (extrapolada desde la concentración total empleando la tasa unión a proteínas) es la porción farmacológicamente activa, ya que es la única que puede atravesar las membranas biológicas e interactuar con un receptor determinado para alterar su función. Sin embargo, esta afirmación resulta controvertida debido a la elevada tasa de reversibilidad de la unión proteína-antimicrobiano (Sevillano D *et al*, 2007).

Figura 2. Representación de los principales parámetros FC/FD.



4.2. FARMACODINÁMICA

Aunque la farmacocinética define la relación entre la concentración de un fármaco y el tiempo, no considera los efectos que los cambios en las concentraciones pueden tener sobre un patógeno. Para resolver este hecho y con el fin de establecer las bases para la correcta adecuación de las concentraciones de un fármaco y sus intervalos de dosificación, a principios de los años 80 surgió el estudio de la farmacodinámica (Wright DH *et al*, 2000). Este término se utiliza para reflejar la relación entre la medida de la exposición de un fármaco en suero, tejido y fluidos del cuerpo con los efectos farmacológicos y toxicológicos de dicho fármaco. En el caso de los antimicrobianos, la farmacodinámica se centra en la relación entre la concentración y la actividad del antimicrobiano (Craig WA, 1998; Craig WA, 2002).

4.3. PATRONES DE ACTIVIDAD BACTERICIDA

Mediante el uso de la CMI como una medida de la potencia de las interacciones fármaco-organismo, los parámetros farmacocinéticos determinantes de la eficacia pueden convertirse en parámetros FC/FD. La farmacodinámica, junto con los parámetros FC/FD, van a permitir optimizar la eficacia clínica y microbiológica, minimizando la presión de selección para evitar el desarrollo de resistencias y determinar un régimen posológico adecuado (Craig WA, 1998).

Tras estudiar la relación entre la concentración de un antibiótico y el efecto bacteriano que produce, los antibacterianos pueden clasificarse en base a sus patrones de actividad bactericida. A pesar de la existencia de un elevado número de clases de

antimicrobianos, se han podido establecer 3 patrones de actividad basados en el tipo de actividad antimicrobiana y la persistencia del efecto antimicrobiano (Craig WA 2002; Canut A *et al*; 2013):

- **Antibióticos con actividad dependiente de la concentración y prolongado efecto post-antibiótico.** Para estos antibióticos concentraciones elevadas muestran mayor eficacia, dando lugar a una muerte más rápida y extensa de los microorganismos que las concentraciones más bajas. De este modo, se observa un perfil de actividad clínica mayor cuando se administran en dosis elevadas y únicas, con independencia del intervalo de administración (Azanza JR, 2005; Soriano F *et al*, 2006). Los índices FC/FD que mejor definen esta relación son el cociente C_{\max}/CMI , que hace referencia a la máxima concentración sérica detectada respecto a la CMI para el microorganismo, y relación ABC/CMI , que hace referencia a la proporción de la concentración de antimicrobiano en sangre en el ABC de 24 horas respecto a la CMI para el microorganismo. Antimicrobianos pertenecientes a este grupo son: aminoglucósidos (C_{\max}/CMI) fluoroquinolonas o daptomicina ($AbC24h/CMI$) y metronidazol (índice FC/FD sin determinar) (Canut A *et al*; 2013; Nielsen E *et al*, 2011).

- **Antibióticos con actividad dependiente del tiempo y efecto post-antibiótico mínimo o moderado.** La eficacia de estos antimicrobianos depende del tiempo durante el cual la concentración se mantiene por encima de la CMI dando lugar a una persistencia del efecto escasa. El recrecimiento del microorganismo puede empezar rápidamente una vez que los niveles de antimicrobiano se encuentran por debajo de la CMI, por lo que la finalidad del régimen de dosificación para estos

antimicrobianos debe ser la optimización de la duración de la exposición. La tasa de muerte más elevada se consigue a concentraciones 4-5 veces superiores a la CMI, sin que un mayor aumento de la concentración produzca un beneficio adicional (Craig WA, 2002). Este patrón se observa en β -lactámicos y macrólidos. El índice FC/FD que mejor define esta relación es el $T_{>CMI}$, es decir, el tiempo durante el cual la concentración de antimicrobiano en suero supera la CMI para el microorganismo. Se mide como porcentaje de un periodo temporal determinado, generalmente 24 horas (Canut A *et al*, 2013). Para los antibióticos β -lactámicos el valor del $T_{>CMI}$ que determina la eficacia va a ser diferente para penicilinas y cefalosporinas, considerándose que se conseguirá el éxito terapéutico si el $T_{>CMI}$ es superior al 40% y 50%, respectivamente. Por debajo de estos valores del $T_{>CMI}$ lo más probable es que se produzca fallo terapéutico (Ball P *et al*, 2002; Craig WA, 1998; Dagan R *et al*, 2001; Nielsen EI *et al*, 2011).

- **Antibióticos con actividad independiente de la concentración y prolongado efecto post-antibiótico.** La eficacia viene determinada por el tiempo durante el cual la concentración de antimicrobiano se mantiene por encima de la CMI con una persistencia de su efecto mucho más prolongada, lo que impedirá el recrecimiento del microorganismo durante el intervalo de dosis. La finalidad del régimen de dosificación es optimizar la cantidad de fármaco administrado para asegurar que no existe recrecimiento entre dosis. Este patrón se observa en tetraciclinas, glucopéptidos, linezolid, clindamicina, azitromicina y glicilglicinas. El índice que mejor determina la eficacia de estos antibióticos es la relación ABC/CMI. (Canut A *et al*, 2013).

4.4. MODELOS FARMACOCINÉTICOS *in vitro*

Los modelos farmacocinéticos *in vitro* son unas herramientas excelentes para el estudio de la actividad de un antimicrobiano a lo largo del intervalo de dosis mediante la simulación de los niveles antibióticos obtenidos *in vivo*. Estos sistemas son flexibles, adaptables, de bajo coste, evitan los problemas éticos del trabajo con animales y muestran una buena correlación con los ensayos realizados en humanos y animales. Además de para conocer el efecto de un antibacteriano sobre un determinado patógeno, estos sistemas permiten estudiar la actividad frente a bacterias con sensibilidad disminuida difíciles de detectar en pacientes, estudiar la aparición de resistencias, determinar el índice FC/FD más adecuado y su magnitud para un determinado antimicrobiano, y establecer los puntos de corte que determinan la sensibilidad de un antimicrobiano frente a un determinado microorganismo (MacGowan & AP Wise R, 2001; Canut A *et al*, 2013).

5. β -LACTÁMICOS

Los antibióticos β -lactámicos se caracterizan por mostrar actividad bactericida lenta, escasa toxicidad, amplio margen terapéutico y ser relativamente independientes de la concentración plasmática (Marín M & Gudiol F, 2003). Estos antibióticos resultan muy importantes en la terapéutica antiinfecciosa, tanto por su potente actividad como por su amplia utilización, siendo los antimicrobianos más prescritos en atención primaria y hospitales. Tradicionalmente, los antibióticos β -lactámicos han

sido el tratamiento de elección frente a las infecciones del tracto respiratorio adquiridas en la comunidad (Calbo E & Garau J, 2005)

Dentro del grupo de los β -lactámicos se engloba un gran número de compuestos antimicrobianos, constituyendo la familia más numerosa de antibióticos. Además de los dos grupos más amplios en número y de mayor importancia, penicilinas y cefalosporinas, se han desarrollado otros como carbapenemas, monobactámicos e inhibidores de β -lactamasas. Aun así, la penicilina sigue siendo el tratamiento de elección en un gran número de infecciones clásicas como son las infecciones respiratorias (García-Rodríguez JA *et al*, 2006).

Estos antibióticos se caracterizan por presentar en su estructura química un anillo β -lactámico que resulta esencial para la actividad. Para dar lugar a los diferentes grupos, el anillo central puede ser modificado mediante la unión de otros radicales, normalmente anillos heterocíclicos, que en algunos tipos de β -lactámicos están complementados con cadenas laterales. Todas las modificaciones, además de ser necesarias para la actividad antimicrobiana, influyen en las propiedades farmacodinámicas, de espectro y actividad (afinidad por las dianas o por las β -lactamasas).

Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de las últimas etapas de la síntesis de la pared celular bacteriana y la posterior muerte celular (Tipper DJ, 1979). En las bacterias grampositivas, la pared celular está formada por una capa gruesa de peptidoglucano, mientras que en las gramnegativas, como *H. influenzae*, presenta una pared más fina y compleja formada por una membrana externa y una delgada capa de

peptidoglucano. El peptidoglucano es la principal estructura que proporciona a la bacteria su forma y ofrece resistencia a la lisis osmótica. Está formado por largas cadenas compuestas por dos azúcares: N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM). En la última etapa de la síntesis del peptidoglucano se forma una malla con estas cadenas en las que el NAM fija cadenas de tetrapéptidos directamente (gramnegativos) o mediante un pentapéptido de glicina (grampositivos). Esta etapa, en la que se realizan las reacciones de transpeptidación, es llevada a cabo por las PBPs, las cuales se localizan generalmente en la cara externa de la membrana citoplasmática. Los antibióticos β -lactámicos se unen covalentemente al sitio activo de estas proteínas impidiendo el desempeño de su función gracias a que el anillo β -lactámico presenta una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina). De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse debido la presión osmótica intracelular. Por tanto, para que los β -lactámicos sean activos es necesario que la bacteria se encuentre en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular (Marín M & Gudiol F, 2003). Además, en algunos microorganismos la acción de las autolisinas desencadenada por los antibióticos β -lactámicos, puede contribuir al efecto antibacteriano (Moreillon P *et al*, 1990).

De este modo, su espectro de acción abarca bacterias grampositivas, gramnegativas y espiroquetas; no siendo activos frente a micoplasmas, ya que éstos carecen de pared bacteriana, ni frente a bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia* (García-Rodríguez JA *et al*, 2006).

5.1. PENICILINAS

Las penicilinas son un grupo de antibióticos naturales y semisintéticos que tienen como núcleo activo el ácido-6-aminopenicilánico. Éste está compuesto por un anillo tiazolidínico asociado a un anillo β -lactámico. A este núcleo se asocia a su vez una cadena lateral que determina muchas de las características antibacterianas y farmacocinéticas de las diferentes penicilinas (Chambers HF, 2006).

La penicilina fue descubierta por Fleming en 1928 (Perlstein D & Liebmann AJ, 1945) y desde entonces se han desarrollado un gran número de agentes con distintas propiedades farmacológicas y actividad antibacteriana debido a la necesidad de vencer la creciente aparición de resistencias (producción de β -lactamasas por estafilococos) y la necesidad de aumentar el espectro para poder tratar bacterias gramnegativas (intrínsecamente resistentes a la penicilina). Las **penicilinas naturales** son las más activas frente a las bacterias grampositivas no productoras de β -lactamasas, anaerobios y algunos cocos gramnegativos. Entre los agentes semisintéticos cabe destacar el grupo de las **penicilinas resistentes a las penicilinasas estafilocócicas** (meticilina, cloxacilina,...) así como el de las **aminopenicilinas** (amoxicilina, ampicilina), las cuales presentan el mismo espectro que la penicilina G y actividad frente a algunas bacterias gramnegativas como *H. influenzae* y *Escherichia coli*, pero son inestables ante la presencia de β -lactamasas (Gruneberg RN, 1980; O'Brien TF *et al*, 1978). El uso de las aminopenicilinas está muy extendido debido a su amplio espectro de actividad, utilizándose fundamentalmente en infecciones de vías respiratorias y urinarias; aunque debido al aumento de las cepas productoras de β -lactamasas de codificación plasmídica ha disminuido su utilidad en algunas zonas. Por

este motivo, se emplea la combinación de estos fármacos con un **inhibidor de β -lactamasas** (amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam,...). Los inhibidores de β -lactamasas son moléculas que conservan en su estructura el anillo β -lactámico, y que presentan una elevada afinidad por las β -lactamasas (mayor que la de los antimicrobianos con los que se asocian), a las que inhiben irreversiblemente, protegiendo de su acción a los β -lactámicos asociados y ampliando el espectro de actividad a bacterias productoras de β -lactamasas (García-Rodríguez JA *et al*, 2006). Por último, las **carboxipenicilinas** y **ureidopenicilinas** muestran actividad frente a bacilos gramnegativos aerobios como *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 2. Penicilinas

Naturales (sensibles a las β -lactamasas)	
Benzilpenicilina (penicilina G)	
Fenoximetilpenicilina (penicilina V)	
Semisintéticas	
R a penicilinasas	Meticilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina
Aminopenicilinas	Ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, pivampicilina
Carboxipenicilinas	Carbencilina, ticarcilina
Penicilina + Inhibidor β-lactamasas	Ampicilina/sulbactam, ticarcilina/ácido clavulánico, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam

5.2. CEFALOSPORINAS

El núcleo activo de las cefalosporinas es el ácido 7-aminocefalosporánico, el cual está formado por un anillo β -lactámico fusionado con un anillo de dihidrotiacina. Las cadenas laterales unidas a este núcleo pueden ser modificadas dando lugar a compuestos con un espectro antimicrobiano mayor y

nuevas características farmacocinéticas. Clásicamente, las cefalosporinas se agrupan en 4 generaciones, cuya evolución se ha acompañado de un incremento de su espectro y su actividad intrínseca frente a gramnegativos, y una progresiva reducción de su actividad frente a grampositivos; aunque esta tendencia se ha alterado en cierta medida en el caso de las cefalosporinas de cuarta generación (García-Rodríguez JA *et al*, 2006).

Tabla 3. Generaciones de cefalosporinas.

1º Generación	2º Generación	3º Generación	4º Generación
Cefazolina	Cefuroxima	Cefotaxima	Cefepima
Cefalotina	Cefamandol	Ceftazidima	Cefpiroma
Cefaloridina	Cefonicid	Ceftizoxima	Cefazopram
Cefapirina	Ceforamida	Cefoperazona	
Cefadroxilo	Cefaclor	Ceftriaxona	
Cefalexina	Cefprozilo	Cefixima	
Cefadrina	Cefotiam	Cefetamet	
Cefatricina	Cefoxitina	Cefpodoxima	
Cefaloglicina	Cefmetazol	Ceftibuteno	
Cefacetrilo	Cefminox	Cefdinir	
Cefroxadina	Cefotetán	Cefodizima	
	Cefbuperazona	Cefditoren	

- **Primera generación:** su espectro es el más reducido, manteniendo una actividad muy pobre frente a bacterias gramnegativas. A pesar de ello, presentan una gran actividad frente a grampositivos exceptuando enterococos, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y SPRP.

- **Segunda generación:** las cefalosporinas pertenecientes a esta generación presentan una actividad similar o ligeramente inferior frente a grampositivos pero adquieren actividad frente a bacterias como *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*. Presentan capacidad para alcanzar el líquido cefalorraquídeo, por lo que pueden ser utilizadas en el tratamiento de la meningitis.

- **Tercera generación:** su actividad frente a los estafilococos se reduce de manera considerable, pero no tanto para otros grampositivos como *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. En cambio, su actividad frente a gramnegativos aumenta de forma significativa ampliándose a especies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros no fermentadores. Son compuestos ampliamente utilizados en la actualidad.

- **Cuarta generación:** presentan un aumento de la actividad frente a especies productoras de cefalosporinasas cromosómicas como *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* o *Citrobacter freundii*.

5.3. β -LACTÁMICOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

5.3.1. Amoxicilina

La amoxicilina es una penicilina oral de amplio espectro que presenta acción bactericida frente a una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas. Su actividad es similar a la de la bencilpenicilina pero con un espectro mucho mayor debido a la presencia de grupos amino en su estructura que le permiten penetrar mejor

en la pared de las bacterias gramnegativas. Es activa frente a organismos grampositivos como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* o *Enterococcus faecalis* y gramnegativos como *M. catarrhalis* o *Neisseria* spp., mostrándose más activa que la bencilpenicilina frente a algunos bacilos gramnegativos como *H. influenzae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*.

Su uso está indicado en el tratamiento de las infecciones respiratorias de vías altas (amigdalitis, sinusitis, otitis media) y bajas (bronquitis aguda y crónica y neumonía producida por estreptococos, estafilococos sensibles, neumococos o *H. influenzae*), así como en diferentes infecciones en las que los principales patógenos son estos microorganismos. Junto con la penicilina es el tratamiento de elección en la faringitis estreptocócica (Shulman ST *et al*, 2012).

5.3.2. Amoxicilina/ácido clavulánico

La amoxicilina resulta sensible frente a la acción de enzimas β -lactamasas producidas por algunas bacterias como *H. influenzae* o *M. catarrhalis* (Gruneberg RN, 1980; O'Brien TF *et al*, 1978), por lo que para que presente actividad frente a estas bacterias se emplea asociada a ácido clavulánico. El ácido clavulánico es un inhibidor competitivo de las β -lactamasas, tanto intracelulares como extracelulares, irreversible y concentración dependiente (Labia R & Peduzzi J, 1978; Reading C & Cole M, 1997). Posee una estructura similar a la penicilina y actúa inactivando un amplio rango de enzimas β -lactamasas, en particular aquellas de importancia clínica que son codificadas en plásmidos. Aunque en general, los inhibidores de β -lactamasas tienen una baja actividad antibacteriana, el ácido clavulánico muestra actividad sinérgica con

amoxicilina y otros β -lactámicos, y contribuye al aumento de las defensas del huésped (Finlay J *et al*, 2003).

Amoxicilina/ácido clavulánico es un antibiótico de amplio espectro que se emplea en el tratamiento de la infección bacteriana causada por cepas resistentes a amoxicilina debido a la producción de β -lactamasas. Con respecto a las enfermedades del tracto respiratorio, se emplea en el tratamiento de la sinusitis bacteriana aguda, otitis media aguda, amigdalitis, exacerbación aguda de bronquitis crónica y neumonía adquirida en la comunidad. Su uso fue introducido en 1981 y desde entonces se han empleado diversas formulaciones tanto orales como inyectables. Una de las formulaciones más recientes es amoxicilina/ácido clavulánico de liberación prolongada (LP) 2000/125 mg, la cual proporciona una liberación inmediata de amoxicilina (1125 mg) y ácido clavulánico (125 mg), y prolongada de amoxicilina (875 mg). Esta formulación presenta una mejora en los tiempos de exposición supra-CMI, lo que supone un incremento de la actividad a la vez que minimiza el desarrollo de resistencias. Con una dosis única de 2000/125 mg la concentración alcanzada permanece por encima de 4 $\mu\text{g/ml}$ durante un 49,4% del tiempo en un intervalo de administración de 12 h, valor inalcanzable con la formulación de liberación inmediata. Por este motivo, esta formulación se muestra muy efectiva en el tratamiento oral de las infecciones bacterianas con CMI a amoxicilina $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, conservando la eficacia frente a las cepas productoras de β -lactamasas (Kaye CM *et al*, 2001). En España, su uso está indicado en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.

5.3.3. Cefuroxima

Cefuroxima es la forma activa de cefuroxima axetil, una cefalosporina oral de segunda generación que presenta actividad antibacteriana *in vitro* contra algunos microorganismos grampositivos y gramnegativos, incluyendo aquellos que se encuentran frecuentemente asociados a diversas infecciones comunes adquiridas en la comunidad. De modo más concreto, es activa frente a cocos grampositivos, algunas enterobacterias y cepas de *S. aureus* y *H. influenzae*, incluyendo las β -lactamasa positivas (Leder RD & Carson DS, 1997). Estudios clínicos demuestran que resulta igual de efectiva que ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico o cefaclor en el tratamiento de la otitis media y las infecciones del tracto respiratorio superior (Marx MA & Fant WK, 1988). Asimismo, se ha observado en ensayos clínicos que dosis de 200 o 500 mg administradas cada 12 horas de 5 a 10 días son efectivas en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior. Por tanto, cefuroxima se muestra como un tratamiento eficaz y bien tolerado en pacientes con diversas infecciones, incluyendo otitis media, faringitis, sinusitis, neumonía adquirida en la comunidad y las exacerbaciones agudas de la bronquitis crónica (Scott LJ *et al*, 2001).

5.3.4. Cefditoren

Cefditoren es la forma activa de cefditoren pivoxilo, una cefalosporina oral semisintética de tercera generación, con un amplio espectro y con gran estabilidad frente a muchas de las β -lactamasas existentes. Es eficaz frente a diversos patógenos

habituales del tracto respiratorio, tanto grampositivos como gramnegativos. En grampositivos, los cuales presentan como principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos la modificación de las PBPs, ofrece buena actividad frente a *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* sensible y con sensibilidad intermedia a penicilina. Entre los microorganismos gramnegativos es sumamente activo frente a *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* y *M. catarrhalis* a pesar de la producción de las β -lactamasas (Wellington K & Curran MP, 2004).

Su actividad antibacteriana, tomando como medida el valor de la CMI, es similar o superior a otros antibióticos habitualmente utilizados (penicilinas, cefalosporinas y fluoroquinolonas). Se consigue un $T_{>CMI} > 40\%$ en *S. pneumoniae* con $CMI \leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ y $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ con dosis de 200 y 400 mg, respectivamente; y en el 100% de los casos de *H. influenzae* (Barberán J & Mensa J, 2009). Es bactericida frente a *S. pneumoniae* (incluidas las cepas resistentes a penicilina), *S. pyogenes*, y *H. influenzae* en concentraciones de una a cuatro veces la CMI, mostrando una elevada tasa de erradicación bacteriológica entre estos patógenos. El uso de cefditoren se recomienda en el tratamiento de la exacerbación aguda de la bronquitis crónica, neumonía comunitaria, faringoamigdalitis aguda, sinusitis maxilar aguda e infección no complicada de piel y tejido blando (cefditoren package insert).

Objetivos

H. influenzae es uno de los principales patógenos causantes infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad, tanto en niños como en adultos, y es responsable de una significativa morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Supone un motivo de preocupación el aumento de la resistencia observado en las últimas décadas a varios de los antibióticos de primera y segunda línea empleados en el tratamiento de estas infecciones. En el caso de los antibióticos β -lactámicos, la resistencia en *H. influenzae* viene definida por el uso de la ampicilina como marcador, donde la mayoría de los aislados resistentes a este antibiótico son productores de β -lactamasas o presentan mutaciones en el gen *ftsI* que codifica la proteína PBP3 (Tristram SG *et al*, 2007).

Hasta hace algunos años, el mecanismo de resistencia más prevalente a β -lactámicos en *H. influenzae* era la producción de β -lactamasas (cepas BLPAR), mientras que las mutaciones en el gen *ftsI* (cepas BLNAR), que se encontraban en menor proporción, presentaban una evolución variable en su prevalencia en función del área geográfica (Tristram SG *et al*, 2007; Ubukata *et al*, 2001; Dabernat H *et al*, 2002; Jansen WT *et al*, 2006). Sin embargo, en la actualidad, se está observando que el porcentaje de cepas BLPAR se está estabilizando o disminuyendo (Dabernat H & Delmas C, 2012; Pérez-Trallero E *et al*, 2010) y, a su vez, el porcentaje de cepas BLNAR y BLPACR está aumentando (Dabernat H & Delmas C, 2012; Park C *et al*, 2013).

Para afrontar el continuo incremento de los fenotipos BLNAR y BLPACR y el subsecuente potencial de diseminación de ambos, se valoró la actividad antimicrobiana frente a *H. influenzae* incluyendo la búsqueda de nuevas alternativas eficaces frente a

estos fenotipos. De este modo, mediante simulación farmacodinámica computerizada se llevaron a cabo dos estudios independientes que permitieron valorar la actividad de diversos β -lactámicos frente a los fenotipos de resistencia de *H. influenzae*. Por último, y empleando la misma metodología, se llevó a cabo el estudio de la actividad de 3 β -lactámicos sobre una población mixta formada por aislados comunes del tracto respiratorio que simulaban un nicho nasofaríngeo. Más concretamente, los objetivos buscados para cada uno de los experimentos fueron:

- **Estudio 1.** Adecuación de los puntos de corte que definen los fenotipos de resistencia BLNAR y BLPACR mediante el estudio de la actividad bactericida de diferentes β -lactámicos:

- Determinar la actividad bactericida de las concentraciones totales obtenidas en suero tras la administración oral de amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg, cefuroxima 500 mg y cefditoren 400 mg frente a cepas de *H. influenzae* con diferentes fenotipos de resistencia.

- Estudiar la influencia de la sensibilidad a ampicilina y la presencia de mutaciones en el gen *ftsI* en la determinación de los puntos de corte de dicho antibiótico para *H. influenzae*.

- **Estudio 2.** Evaluación del papel de la unión a proteínas en la actividad de nuevas alternativas frente a los fenotipos de resistencia de *H. influenzae*:

- Investigar la actividad bactericida de las concentraciones totales y libres de amoxicilina/ácido clavulánico de liberación prolongada 2000/125 mg y cefditoren 400 mg frente a cepas de *H. influenzae* con diferentes fenotipos de resistencia.

- Estudiar el papel de la unión a proteínas en la actividad de estos dos fármacos mediante la comparación de las concentraciones totales y libres.

- Estudiar la influencia de la producción de la β -lactamasa TEM-1 en la actividad farmacodinámica de estos dos antibióticos.

- **Estudio 3:** Actividad de diferentes β -lactámicos sobre una población polimicrobiana formada por aislados comunes del tracto respiratorio:

- Conocer el efecto de las concentraciones libres de amoxicilina/ácido clavulánico 875 mg, amoxicilina 875 mg y cefditoren 400 mg sobre una población mixta formada por *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*.

- Estudiar el fenómeno de patógeno indirecto sobre un nicho compuesto por aislados nasofaríngeos en un modelo farmacodinámico *in vitro*.

- Estudiar la influencia de la producción de la β -lactamasa TEM-1 en la actividad farmacodinámica de estos antibióticos.

Material y Métodos

1. CEPAS

Las cepas empleadas en los diferentes estudios fueron aislados clínicos procedentes de pacientes con infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad obtenidos durante el año 2006, que pertenecían a la colección del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

En el primer estudio se emplearon cuatro aislados de *H. influenzae* con diferentes fenotipos de resistencia: una cepa BLNAS, una cepa BLPAR, una cepa BLNAR y una cepa BLPACR. Las cepas BLNAR y BLPACR presentaban la mutación N526K en el gen *ftsI* que codifica la proteína PBP3. La β -lactamasa detectada en las cepas BLPAR y BLPACR fue del tipo TEM-1.

En el segundo estudio se emplearon 3 aislados de *H. influenzae*: una cepa BLNAS, una cepa BLNAR que presentaba la mutación N526K en el gen *ftsI* y una cepa BLPACR que presentaba esta misma mutación y además sintetizaba la β -lactamasa TEM-1.

En el tercer estudio se emplearon cuatro aislados clínicos: una cepa de *S. pyogenes*, una cepa de *S. pneumoniae* resistente a penicilina serotipo 14, una cepa de *H. influenzae* productora de β -lactamasas tipo TEM-1 (BLPAR) y una cepa de *H. influenzae* productora de β -lactamasas tipo TEM-1 portadora de la mutación N526K en el gen *ftsI* (BLPACR). La cepa BLPAR fue resistente a trimetoprim (CMI = 128 μ g/ml) y la cepa BLPACR fue sensible (CMI = 0,12 μ g/ml); diferencia que fue usada para discriminar ambas cepas a lo largo del estudio.

La presencia de β -lactamasas se detectó mediante el método de la nitrocefina (O'Callaghan CH *et al*, 1972). Las mutaciones en el gen *ftsI* y la presencia del gen *bla_{TEM}* fueron determinados mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación directa (Dabernat H *et al*, 2002; Scriver SR *et al*, 1994).

2. MEDIOS DE CULTIVO Y ESTUDIOS PRELIMINARES

Las cepas de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* empleadas en los diferentes estudios se conservaron congeladas a -40°C en viales tipo eppendorf que contenían leche descremada a partir de un cultivo crecido en medio sólido (Skym Milk, Difco, Detroit, Mich.). Para la recuperación y posterior crecimiento en placa de las cepas de *H. influenzae*, se utilizó el medio agar chocolate formado por agar GC (Difco laboratories, Le Pont-de-Claix, Francia) al que se añadió sangre desfibrinada de carnero al 5% (Biomedics, Madrid). Esta mezcla fue tratada a 80°C durante 10 minutos para conseguir el chocolateado de la sangre. Posteriormente, a una temperatura de 50°C se añadieron los factores VX (Difco laboratories, Le Pont-de-Claix, Francia). Para las cepas de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* se empleó agar Müeller-Hinton suplementado con sangre desfibrinada de carnero al 5%. Las placas se incubaron en atmósfera con 5% de CO₂, durante 24 horas a una temperatura de 35°C.

Para el estudio de la CMI y la realización de las simulaciones farmacodinámicas de los dos primeros estudios se empleó el medio el recomendado por el CLSI para *H. influenzae*, *Haemophilus* Test Medium (HTM) (CLSI, 2006). Este medio consta de caldo Müeller-Hinton ajustado en cationes (25 µg/ml de calcio y 12,5

µg/ml de magnesio) (Panreac, Barcelona, España), 15 µg/ml de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), 15 µg/ml de hemina (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA) y 5 mg/ml de extracto de levadura (Difco laboratorios, Le Pont-de-Claix, Francia).

Para el tercer estudio, debido a la variedad de especies que debían cultivarse conjuntamente, se realizaron pruebas preliminares para determinar qué medio mostraba la mejor tasa de crecimiento a lo largo de 24 h para todas las cepas. Los medios de cultivo ensayados fueron los siguientes:

- a) Caldo Müeller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de carnero lisada como medio recomendado para el cultivo de estreptococos (CLSI, 2006).
- b) HTM como medio recomendado para *H. influenzae* (CLSI, 2006).
- c) Caldo Todd-Hewitt (Difco laboratorios, Le Pont-de-Claix, Francia) suplementado con 5 mg/ml de extracto de levadura.
- d) Caldo Todd-Hewitt suplementado con 15 µg/ml de NAD⁺, 15 µg/ml de hemina y 5 mg/ml de extracto de levadura (THS, Todd-Hewitt Suplementado). Este medio mostró la mejor tasa de crecimiento para todas las cepas (datos no mostrados) y fue el medio seleccionado para llevar a cabo las simulaciones farmacodinámicas.

Las CMI's de las cepas seleccionadas en el tercer estudio fueron llevadas a cabo tanto con los medio recomendados por el CLSI, HTM para *H. influenzae* y caldo Müeller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de carnero lisada para *S.*

pneumoniae y *S. pyogenes* (CLSI, 2006) como con el medio empleado durante las simulaciones farmacodinámicas, THS.

3. ANTIMICROBIANOS

Las empresas que suministraron la sustancia valorada de cada antibiótico se detallan en la Tabla 4. Para su disolución se emplearon los solventes recomendados por el CLSI (CLSI, 2008). Cada antimicrobiano fue preparado inmediatamente antes de su uso.

Tabla 4. Antimicrobianos usados en los estudio.

Antimicrobianos	Laboratorio
Ampicilina	GlaxoSmithKline
Amoxicilina	GlaxoSmithKline
Ácido clavulánico	GlaxoSmithKline
Cefuroxima	GlaxoSmithKline
Cefditoren	Tedec-Meiji Farma

4. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD

Se determinó la sensibilidad a los antimicrobianos anteriormente mencionados (empleando amoxicilina y ácido clavulánico en combinación con una proporción 2:1) mediante la técnica de microdilución en caldo siguiendo las indicaciones propuestas por el CLSI (CLSI, 2006). Se empleó como medio de cultivo el recomendado por el CLSI y, para determinar la sensibilidad de las cepas del tercer estudio, también THS.

Las CMI se realizaron por triplicado, antes y después del proceso de simulación, considerándose el valor modal.

A partir de un cultivo fresco crecido en medio sólido, se realizó un inóculo en solución salina al 0,9% hasta alcanzar una turbidez correspondiente a un 0,5 McFarland (equivalente a 10^8 UFC/ml). A continuación realizó una dilución 1:100 en el caldo de cultivo correspondiente para alcanzar una concentración de aproximadamente 10^6 UFC/ml. Un volumen de 100 µl de cada inóculo fue depositado en pocillos de placas microtiter (Soria genlab S.A., Madrid) en los que previamente se habían depositado concentraciones crecientes de antimicrobiano (volumen final 200µl). Tras 18-24 horas de incubación se determinó la CMI, definida como la concentración más baja de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano visible. Para conocer la sensibilidad de las cepas de *H. influenzae* se emplearon como cepas control *H. influenzae* ATCC 49247 para ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y cefditoren; y *H. influenzae* ATCC 49766 para cefuroxima. Cuando se realizó la CMI de las cepas de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* se empleó como cepa control *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Los puntos de corte propuestos por el CLSI (CLSI, 2014) y la BSAC (BSAC, 2013) se pueden comparar en la Tabla 5. Los puntos de corte propuestos por el CLSI (CLSI, 2014) son los que se emplean en la rutina, aunque diversos organismos también han determinado estos valores. Según este comité los resultados obtenidos para ampicilina deben ser usados para predecir la sensibilidad a amoxicilina (CLSI, 2014). No están definidos los puntos de corte en el CLSI o la BSAC para cefditoren, pero a

los puntos de corte sugeridos para determinar la sensibilidad son $\leq 0,25$ - ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ (Johnson DM *et al*, 2000; Jones RN *et al*, 1998; Peric M *et al*, 2003).

Tabla 5. Puntos de corte de los diferentes β -lactámicos para *H. influenzae*.

Antibiótico	CLSI			BSAC	
	R	I	S	R	S
Ampicilina	≥ 4	2	≤ 1	> 1	≤ 1
AML	-	-	-	> 2	≤ 2
AMC	$\geq 8/4$	-	$\leq 4/2$	> 2	≤ 2
CXM	≥ 16	8	≤ 4	> 2	≤ 1

AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, AML: amoxicilina, CXM: cefuroxima,
R: Resistente, I: Intermedio, S: Sensible.

5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β -LACTAMASA

La producción de β -lactamasas fue determinada empleando el método de la cefalosporina cromogénica modificado. En este procedimiento se emplea la nitrocefina como sustrato (O'Callaghan CH *et al*, 1972). En resumen, se añadieron 25 μl de una solución de 500 $\mu\text{g/ml}$ de nitrocefina (Nitrocefín, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) a 225 μl de muestra y se incubó durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 500 μl de tampón fosfato 0,05 M y se midió espectrofotométricamente la absorbancia a 486 nm (A_{486}), usando caldo de cultivo como blanco. Se empleó como cepa control *H. influenzae* ATCC 49247.

En el primer estudio se midió la actividad β -lactamasa en los tiempos 0, 4, 8 y 12 h y en el segundo y tercer estudio se midió la actividad de la cepa BLPACR (en el

tercer estudio en las simulaciones llevadas a cabo con antibiótico y el inóculo mixto) y en los tiempos 0 y 24 para las cepas no productoras de β -lactamasa.

6. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE *H. influenzae*

6.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Se obtuvo el ADN total de cada cepa de *H. influenzae* utilizando el kit comercial QIAamp® DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany). Cada muestra se conservó en tampón Tris-EDTA a -40°C. El ADN extraído fue usado como molde en todas las amplificaciones realizadas.

6.2. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Para realizar la amplificación mediante PCR de los genes *ftsI*, *acrR*, *bla_{TEM}* y *bla_{ROB}* se utilizó un aparato termociclador Mastercycler® gradient de Eppendorf. Las concentraciones alcanzadas en la mezcla de reacción (volumen final 50 μ l) fueron:

- 1 μ M de cada cebador (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (Tabla 6)
- 1,5 mM Cl_2Mg (Biotools, Madrid, España)
- 200 μ M dNTPs (Biotools, Madrid, España)
- 0,4 U de Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España)

Una vez concluida la amplificación, los productos de PCR fueron almacenados a -40°C o bien procesados inmediatamente para comprobar si existían mutaciones en los genes *ftsI* y *acrR* y la presencia/ausencia de los genes *bla_{TEM}* y *bla_{ROB}* en las cepas del estudio.

6.3. CEBADORES EMPLEADOS

La amplificación mediante PCR fue llevada a cabo empleando los siguientes cebadores de referencia descritos previamente por otros autores (Tabla 6):

Tabla 6. Cebadores utilizados para la amplificación de los diversos genes.

Gen	Cebador (5'-3')	Fuente
<i>ftsI</i>	GTTGCACATATCTCCGATGAG CAGCTGCTTCAGCATCTTGC	Ubukata <i>et al</i> , 2001
<i>acrR</i>	CCTACAGAATAAGTATTGTTACG CTCGGCCTTATCATTACGCC	Kaczmarek <i>et al</i> , 2004
<i>bla_{TEM}</i>	GTGTTATCACTCATGGTTATG GAATTCTTGAAGACGAAAGGG	Scriver <i>et al</i> , 1994
<i>bla_{ROB}</i>	CGCCCAATTCTGTTCATT GTTGATATIGTTCCACGC	Scriver <i>et al</i> , 1994

6.4. DETECCIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS

AMPLIFICADOS

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Certified PCR Agarose, BIO-RAD, Madrid, España). Una vez finalizada la electroforesis, se tiñeron los geles en una solución de Bromuro de Ethidio (USB, Cleveland, Ohio) (0,5 mg/l) y se lavaron con agua destilada durante unos minutos. La visualización de las bandas correspondientes a los productos se realizó utilizando la luz ultravioleta del sistema Gel Doc (BIO-RAD, Madrid, España).

Los productos de amplificación fueron purificados mediante el sistema *Montage* PCR (Millipore, Madrid, España) para eliminar restos de sales e impurezas. Posteriormente, cada muestra fue enviada al Centro de Secuenciación (unidad genómica) de la Universidad Complutense de Madrid, donde se llevó a cabo la secuenciación utilizando el reactivo Abi Prism Big Dye Terminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Madrid, España). Las muestras fueron analizadas en un secuenciador 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems Madrid, España).

6.5. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

Para visualizar la correcta interpretación de las secuencias obtenidas se utilizó el programa *Chromas* (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). A continuación, estas secuencias fueron comparadas mediante el programa de análisis de secuencias *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk>).

7. MODELO FARMACOCINÉTICO *in vitro*

Para llevar a cabo el estudio de la actividad de los antimicrobianos a lo largo del intervalo de dosis mediante la simulación de los niveles antibióticos obtenidos *in vivo* se empleó un sistema farmacodinámico de dos compartimentos, el cual permite exponer la bacteria a cambios en las concentraciones de antibiótico evitando la dilución del inóculo bacteriano junto con el fármaco. Este sistema totalmente informatizado, basado en el inicialmente propuesto por Blaser *et al*, fue adaptado para simular las combinaciones de agentes que presentan diferentes niveles de aclaramiento (Blaser *et al*, 1985; Alou L *et al*, 2005).

El compartimento central, el cual representa la circulación sistémica, está constituido por un frasco de doble camisa (Bellco Glass, Vineland, NJ) donde se dispondrá el caldo de cultivo (denominado Vd), la tubería de conexión y el interior de las fibras de un dializador con un volumen de cebado de 60 ml y una superficie de filtración de 1m² (FX50 helixone dialyzer, Fresenius Medical Care S.A., Barcelona, España). El compartimento periférico o sitio de infección, donde se incubó el microorganismo, está formado por el espacio extracapilar del dializador y la tubería de recirculación externa. La amplia tasa superficie-volumen de la unidad de diálisis (>200 cm²/ml) garantiza el rápido equilibrio de la concentración de antimicrobiano entre los dos compartimentos. El volumen de distribución, o valor total del sistema, fue de 350 o 450 ml, según los estudios.

El descenso exponencial de la concentración de antibiótico se realizó mediante un proceso continuo de dilución-eliminación llevado a cabo por bombas peristálticas computerizadas (Masterflex; Cole-Parmer Instrument Company, Chicago Ill),

utilizando el software Win Lin v.2 (Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, Ill.). Estas bombas empujaron el caldo de cultivo desde el reservorio de medio fresco, situado en el interior de un baño a 36° C, hacia el compartimento central, donde se iba realizando la dilución del antibiótico. La eliminación del medio de cultivo a la misma velocidad de incorporación del medio fresco, permitió simular la $T_{1/2}$ del antimicrobiano manteniendo el volumen del sistema constante. El antibiótico fue administrado mediante una bomba de dosificación (402 Dilutor Dispenser; Gilson S.A., Villiers-le-Bel, France), programada en flujo y volumen para alcanzar la C_{max} en el T_{max} característico de cada antimicrobiano simulado. La mezcla fue bombeada desde el compartimento central hacia el periférico a una velocidad constante de 50 ml/min, atravesó el interior de los capilares de fibra hueca, y regresó más tarde en sentido inverso a través de la segunda cápsula hacia el compartimento central. Bombas adicionales movieron la mezcla en el interior del compartimento periférico dentro del espacio extracapilar a través de la tubería externa a una velocidad constante de 25 ml/min. Ambos compartimentos fueron mantenidos a 36°C durante toda la simulación (Figura 3).

Para llevar a cabo las simulaciones con amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000/125 mg que produce la liberación inmediata de amoxicilina y ácido clavulánico y la liberación sostenida de amoxicilina fue necesario realizar una modificación del sistema farmacocinético que permitiese ajustar esta dosis. De este modo, se introdujo un frasco denominado Vs (volumen suplementario), que permitió simular la liberación sostenida de dicho antibiótico. Este frasco recibía medio de cultivo fresco desde el reservorio y se conectaba, a su vez, con el compartimento central (Figura 4).

Figura 3. Esquema general del modelo compartimental: 1. Compartimento central (Frasco Bellco de doble camisa), 2. Reservorio con caldo fresco, 3. Eliminación, 4. Bombas peristálticas, 5. Bomba de inyección, 6. Tubería PTFE, 7. Tubería de silicona, 8. Compartimento periférico (capsulas de fibra hueca), 9. Puerto de inoculación, 10. Puerto de muestreo, 11. Red RS-232, 12. Red GSIOC, 13. Sonda de temperatura conectada a baño termostatzado, 14. Filtros de aire y 15. Incubador.

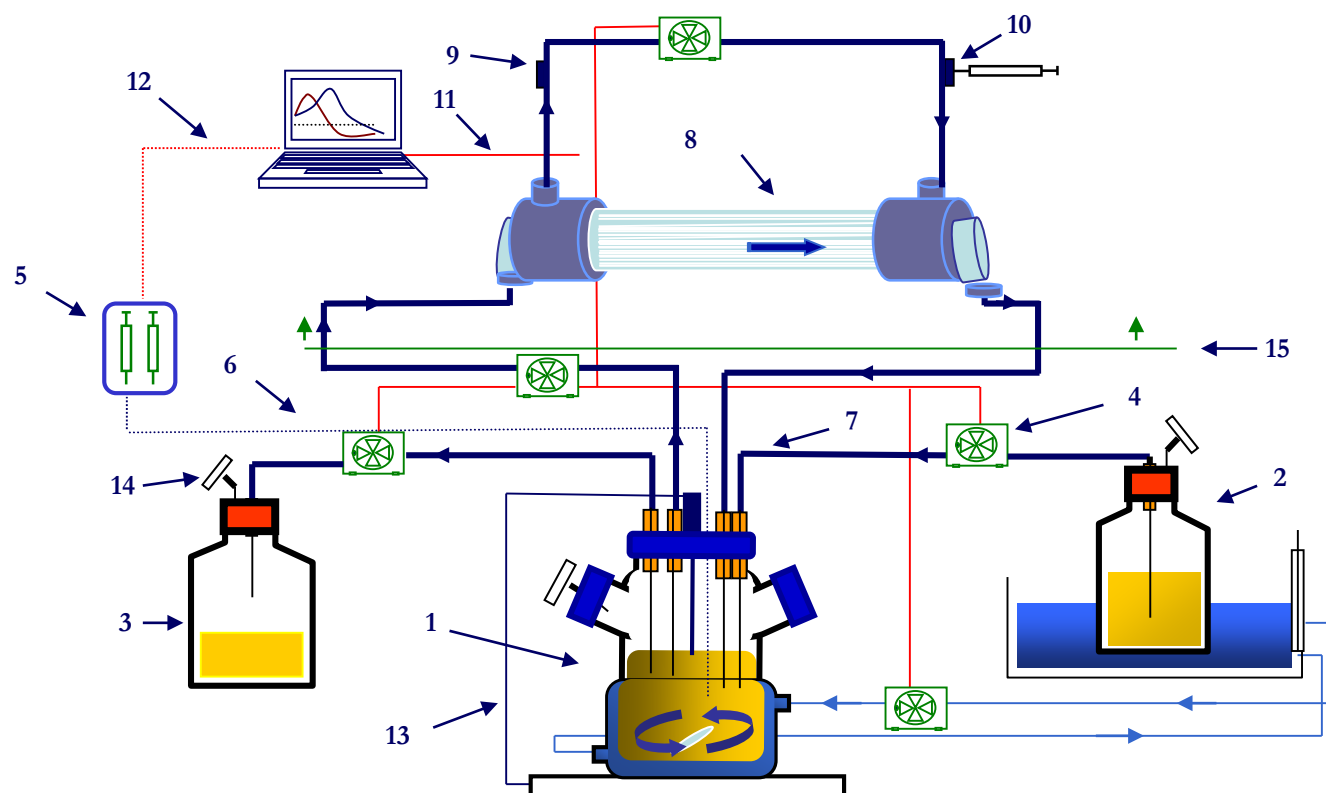
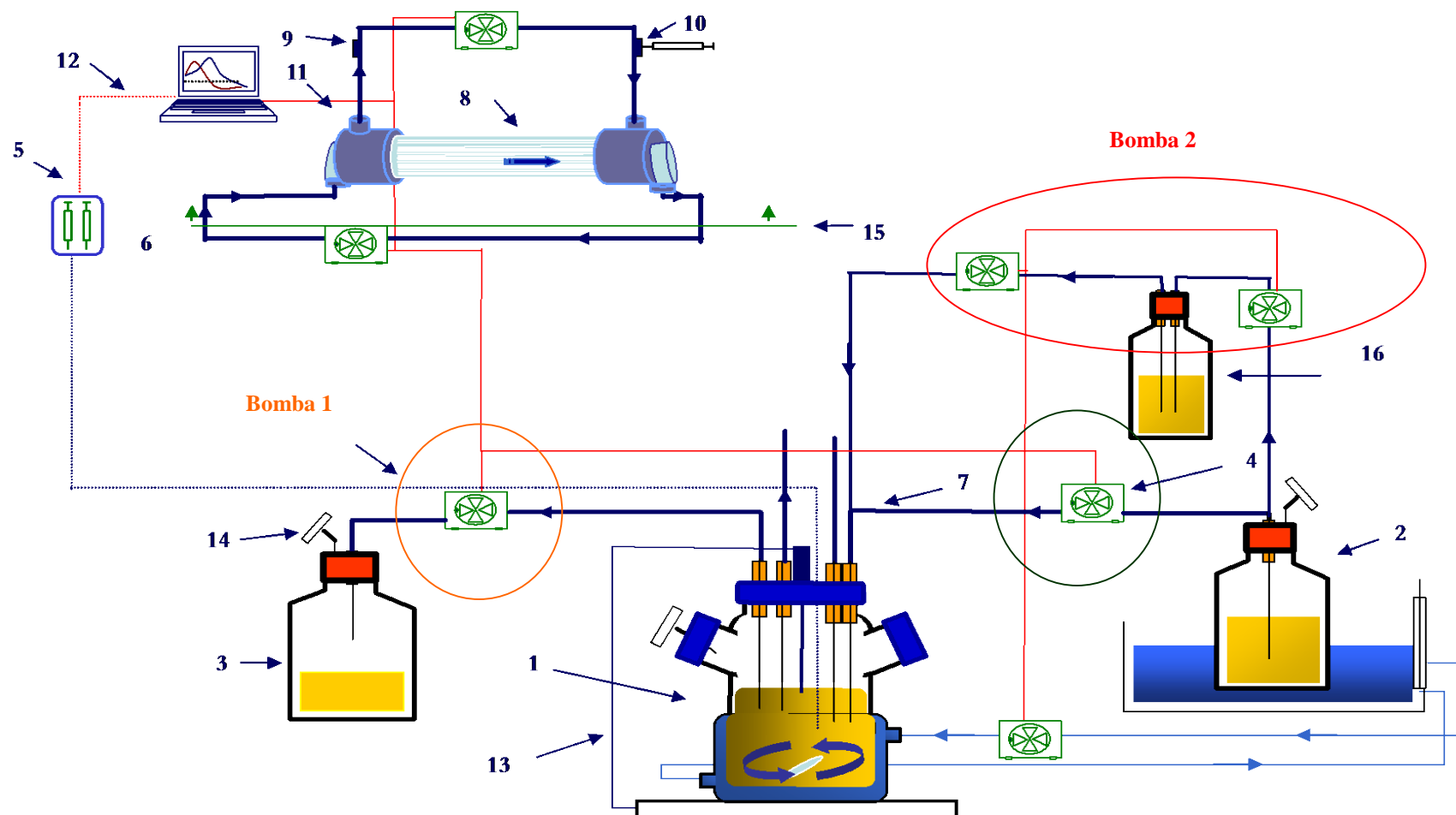


Figura 4. Esquema general del modelo compartimental utilizado para amoxicilina/ácido clavulánico LS 2000/125 mg: 1. Compartimento central (Frasco Bellco de doble camisa), 2. Reservorio con caldo fresco, 3. Eliminación, 4. Bombas peristálticas, 5. Bomba de inyección, 6. Tubería PTFE, 7. Tubería de silicona, 8. Compartimento periférico (capsulas de fibra hueca), 9. Puerto de inoculación, 10. Puerto de muestreo, 11. Red RS-232, 12. Red GSIOC, 13. Sonda de temperatura conectada a baño termostatzado, 14. Filtros de aire, 15. Incubador y 16. Compartimento Vs.



8. REGÍMENES TERAPÉUTICOS SIMULADOS

En el **Estudio 1** se realizaron simulaciones a lo largo de 24 h para las concentraciones totales obtenidas en suero de cefditoren-pivoxilo 400 mg cada 12 h (Mulford D, 2000a), amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg cada 8 o cada 12 h (Vree TB, 2003; Burkhardt O, 2002) y cefuroxima-axetilo 500 mg cada 12 h (Finn A, 1987; Sommers DK, 1984). Los parámetros farmacocinéticos buscados, basados en la media de los valores obtenidos en humanos fueron $C_{\max} = 4,20 \mu\text{g/ml}$, $T_{\max} = 2,75 \text{ h}$, y $T_{1/2} = 1,55 \text{ h}$ para cefditoren; y $C_{\max} = 7,70 \mu\text{g/ml}$, $T_{\max} = 3,0 \text{ h}$, y $T_{1/2} = 1,10 \text{ h}$ para cefuroxima. Para las simulaciones con la combinación amoxicilina/clavulánico, la vida media y la T_{\max} del ácido clavulánico empleadas fueron: $T_{\max} = 1,0 \text{ h}$, y $T_{1/2} = 1,1 \text{ h}$; la C_{\max} para amoxicilina fue $10,30 \mu\text{g/ml}$, y $2,40 \mu\text{g/ml}$ para el ácido clavulánico.

En el **Estudio 2** se realizaron simulaciones a lo largo de 48 h de las concentraciones totales y libres obtenidas en suero de cefditoren-pivoxilo 400 mg cada 12 h (Mulford D, 2000a, Mulford D, 2000b) y amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000/125 mg cada 12 h (Kaye CM, 2001). Los parámetros farmacocinéticos, basados en la media de los valores obtenidos en humanos fueron $C_{\max} = 4,20 \mu\text{g/ml}$, $T_{\max} = 2,75 \text{ h}$, y $T_{1/2} = 1,55 \text{ h}$ para cefditoren. Asumiendo que la unión a proteínas es del 88% (Wellington K & Curran MP, 2004), la C_{\max} fue $= 0,5 \mu\text{g/ml}$. Los parámetros farmacocinéticos para amoxicilina/ácido clavulánico fueron los siguientes: C_{\max} total $= 17 \mu\text{g/ml}$, C_{\max} libre $= 13,9 \mu\text{g/ml}$ (unión a proteínas del 18%), $T_{\max} = 1,5 \text{ h}$, y $T_{1/2} = 1 \text{ h}$ para amoxicilina; y C_{\max} total $= 2 \mu\text{g/ml}$, C_{\max} libre $= 1,5 \mu\text{g/ml}$ (unión a proteínas del 25%), $T_{\max} = 1,5 \text{ h}$, y $T_{1/2} = 1 \text{ h}$ para el ácido clavulánico.

En el **Estudio 3** se realizaron simulaciones a lo largo de 24 h de las concentraciones libres obtenidas en suero de cefditoren-pivoxilo 400 mg cada 12 horas (cefditoren package insert), amoxicilina 875 mg cada 8 horas (augmentin package insert) y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg cada 8 horas (augmentin package insert), empleando los porcentajes de unión a proteínas del 18% para amoxicilina, 25% para ácido clavulánico y 88% para cefditoren. Los parámetros farmacocinéticos buscados para las concentraciones totales fueron: $C_{\max} = 4,5 \mu\text{g/ml}$ y $T_{1/2} = 1,55 \text{ h}$ para cefditoren; $C_{\max} = 11,6 \mu\text{g/ml}$ y $T_{1/2} = 1,15 \text{ h}$ para amoxicilina; y $C_{\max} = 2,20 \mu\text{g/ml}$ y $T_{1/2} = 1,15 \text{ h}$ para ácido clavulánico.

Para llevar a cabo los experimentos con cefditoren 400 mg, cefuroxima 500 mg, amoxicilina 875 mg y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg se aplicaron dos tasas de aclaramiento equivalentes a la fase de absorción y eliminación en un volumen de distribución, que según los estudios, fue de 350 o 450 ml. Para llevar a cabo las simulaciones con amoxicilina y ácido clavulánico en combinación hay que tener en cuenta que estos dos antibióticos presentan diferente vida media. La simulación en los sistemas farmacodinámicos de uno o múltiples compartimentos de estos antimicrobianos es posible gracias a las ecuaciones y el diseño experimental previamente desarrollados por Blaser *et al* (Blaser *et al*, 1985). En este estudio, donde amoxicilina y ácido clavulánico presentan vidas medias muy similares, el aclaramiento desde el compartimento central se estableció de acuerdo al antibiótico simulado con menor vida media, y por tanto, mayor aclaramiento; que para estos antibióticos fue el ácido clavulánico (Cl_{clav}).

Para amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000/125 mg, debido a que además de la liberación inmediata, se produce una liberación sostenida de amoxicilina, este antibiótico fue suplementado desde el reservorio V_s mediante una administración *in bolus*. El aclaramiento de este nuevo compartimento, V_s , fue el equivalente a la diferencia entre Cl_{clav} y el del antibiótico con mayor vida media que, en este caso, es la amoxicilina, Cl_{amox} . Para mantener el volumen de todo el sistema constante, se incorporó al sistema caldo fresco a un flujo idéntico al del aclaramiento de la amoxicilina, Cl_{amox} . En este caso se consideró una eliminación trifásica.

9. CURVAS DE MUERTE BACTERIANA

En los dos primeros estudios, la preparación del inóculo de cada una de las cepas seleccionadas se realizó a partir de un pase reciente en agar chocolate suspendiendo colonias bien diferenciadas en un volumen de 70 ml de caldo HTM. La mezcla fue incubada y monitorizada mediante espectrofotómetro-UV (Hitachi-U-1100) hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a un 0,5 McFarland (10^8 UFC/ml).

Para el tercer estudio a partir de un pase reciente en agar chocolate para *H. influenzae* o en agar sangre para el crecimiento de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*, se suspendieron varias colonias bien diferenciadas en un volumen de 2-3 ml de caldo THS hasta conseguir una densidad bacteriana, calculada espectrofotométricamente, de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml. Posteriormente, para los inóculos individuales, 1 ml de la mezcla precedente se diluyó en 70 ml de caldo THS para disponer un inóculo inicial de aproximadamente 10^6 UFC/ml. Para los inóculos mixtos, 1 ml de cada

suspensión individual ajustada a 1×10^8 UFC/ml fueron adicionados en proporción 1:1:1:1 a 100 ml de caldo THS dejando un inóculo final de aproximadamente 4×10^6 UFC/ml.

A continuación, se introdujeron a vacío 60 ml de cada cultivo, individual o mixto, en el compartimento periférico del sistema previamente atemperado e hidratado a través de una llave de tres vías situada en la tubería de recirculación y se preincubó durante una hora. A los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h en el primer estudio; 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 34, 36, y 48 h en el segundo; 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h en el tercero, y el tiempo correspondiente a la T_{\max} de cada antibiótico se extrajeron aproximadamente 500 μ l desde el compartimento de infección. De cada muestra, se diluyeron seriadamente 200 μ l (1:10) en solución salina fría al 0,9% y se sembraron 20 μ l de cada dilución (al menos 4 diluciones por placa). En los dos primeros estudios los diferentes tiempos de toma de muestra fueron sembrados en agar chocolate, mientras que en el tercero fueron sembrados en varios medios de cultivo para poder diferenciar las especies:

- a) Agar sangre: crecimiento de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* que se identificaron gracias sus diferentes propiedades hemolíticas (α -hemólisis para *S. pneumoniae* y β -hemólisis para *S. pyogenes*).
- b) Agar chocolate: crecimiento de las dos cepas de *H. influenzae*, que se diferencian de las dos especies de estreptococos por su morfología.
- c) Agar chocolate con 4 μ g/ml de trimetoprim: crecimiento de la cepa BLPAR e inhibición del crecimiento de la cepa BLPACR. El conteo de colonias de

la cepa BLPACR se realizó mediante la diferencia entre ambas placas de agar chocolate. La población total se estableció sumando las colonias crecidas en agar sangre, correspondientes a *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* y las colonias de *H. influenzae* crecidas en el medio agar chocolate.

A continuación todas las placas fueron incubadas a 37°C con 5% CO₂ durante 24 h para proceder al posterior recuento de microorganismos viables. El límite de detección fue de 50 UFC/ml. Cada experimento fue efectuado por triplicado.

10. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICOS

Para medir las concentraciones de antimicrobiano simuladas, se tomaron alícuotas adicionales de 500 µl desde el compartimento periférico a los tiempos anteriormente mencionados para cada experimento. Las concentraciones fueron determinadas por triplicado mediante bioensayo tridimensional (el antimicrobiano difunde desde un pocillo realizado en el agar de la placa) empleando las cepas indicadoras características (ver Tabla 7) para cada antimicrobiano (Andrews JM, 1999). Además, en el tercer estudio se analizó la farmacocinética tanto en las curvas de muerte bacteriana como en las simulaciones con antibiótico en ausencia de microorganismo (llevadas a cabo para ajustar el modelo). Todas las muestras fueron guardadas a -40°C hasta su uso.

Para llevar a cabo el ensayo se inocularon las placas con el microorganismo indicador y cada uno de los pocillos con 75 µl de muestra. Los estándares y las diluciones se prepararon en el mismo medio empleado durante la simulación

farmacocinética. A continuación las placas se incubaron a 36°C durante 24 horas, transcurridas las cuales se procedió a la lectura de los resultados mediante un calibrador electrónico (Sylvac Euro-Cal Mark III, Fowler Scientific, Suiza). Para ello, se midió en milímetros el diámetro halo de inhibición que produjo cada una de las muestras.

Tabla 7. Requisitos para el bioensayo de los diferentes antibióticos simulados.

Antibiótico	Medio	Microorganismo indicador	λ (nm)	Abs	Intervalo lineal ($\mu\text{g/ml}$)
Cefditoren	ANT 1	<i>Morganella morganii</i> ATCC 8076H	580	0,065	0,03-4
Cefuroxima	ANT 1	<i>Bacillus subtilis</i> en espora	-	-	2-32
	ANT 2	ATCC 6633	-	-	0,5-8
Amoxicilina	ANT 1	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	630	0,2	1-0,03
Ácido clavulánico	MHA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665	640	0,04	4-0,125

11. ANÁLISIS DE DATOS

11.1. ANÁLISIS DE LA FARMACOCINÉTICA

Las concentraciones de antimicrobiano fueron analizadas mediante una aproximación no compartimental usando el programa WinNonlin 5.2 Professional (Pharsight, Mountainview, Ca, USA). La C_{\max} y la T_{\max} fueron obtenidas directamente de los datos observados. El ABC desde la hora 0 a la 24 (ABC_{0-24}) fue calculada mediante una regla trapezoidal. Según el estudio, el $T_{>C_{MI}}$ fue calculado gráficamente a partir de la concentración media en cada punto frente al tiempo y se expresó como

el porcentaje del intervalo de dosis para cada cepa, o fue calculado mediante una aproximación no compartimental para los datos farmacodinámicos usando el modelo 220 del programa WinNolin.

11.2. VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO

Se calcularon las diferencias en \log_{10} entre el inóculo inicial y el conteo de colonias para cada uno de los tiempos estudiados. Las diferencias entre antibióticos para cada cepa, o entre cepas para cada antibiótico fueron determinadas a las 12 y 24 h (también los tiempos 6, 36 y 48 para el segundo estudio) mediante el análisis de la t de Student. Ya que los experimentos fueron realizados por triplicado se consideró un valor de $p < 0,01$ estadísticamente significativo tras el ajuste alfa.

Resultados

1. ESTUDIO 1: Adecuación de los puntos de corte que definen los fenotipos de resistencia BLNAR y BLPACR mediante el estudio de la actividad bactericida de diferentes β -lactámicos.

1.1. FARMACOCINÉTICA

Los valores de los parámetros farmacocinéticos C_{\max} , T_{\max} , $T_{1/2}$, y ABC obtenidos durante el experimento se muestran en la Tabla 8. Los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos fueron similares a los parámetros buscados (descritos previamente en Material y Métodos).

Tabla 8. Media de los parámetros farmacocinéticos observados y desviación estándar.

Parámetros	Cefditoren	Cefuroxima	Amoxicilina	Clavulánico
C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$) \pm DE	4,1 \pm 0,30	7,7 \pm 0,2	10,4 \pm 0,4	2,4 \pm 0,5
T_{\max} (h) \pm DE	3,0 \pm 0,00	3,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0
$T_{1/2}$ (h) \pm DE	1,7 \pm 0,20	1,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0	1,2 \pm 0,2
ABC ₀₋₁₂ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) \pm DE	16,4 \pm 1,4	22,2 \pm 1,1	24,4 \pm 1,3	5,5 \pm 1,1
ABC ₀₋₈ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) \pm DE	-	-	24,1 \pm 1,3	5,5 \pm 1,1

ABC₀₋₁₂: ABC correspondiente al periodo de dosificación cada 12 h; ABC₀₋₈: ABC correspondiente al periodo de dosificación cada 8 h; DE: desviación estándar.

La cinética de los valores obtenidos mediante bioensayo y de los valores esperados se representó en la Figura 5, donde puede observarse que existe un buen ajuste de los datos obtenidos a los esperados. Los coeficientes de variación intradía e interdía obtenidos para los bioensayos de los diferentes antibióticos fueron de 2,3% y 8,2%, respectivamente, para una concentración de cefditoren de 0,75 $\mu\text{g/ml}$; 8% y 1,5%, respectivamente, para una concentración de amoxicilina de 0,3 $\mu\text{g/ml}$; 3% y

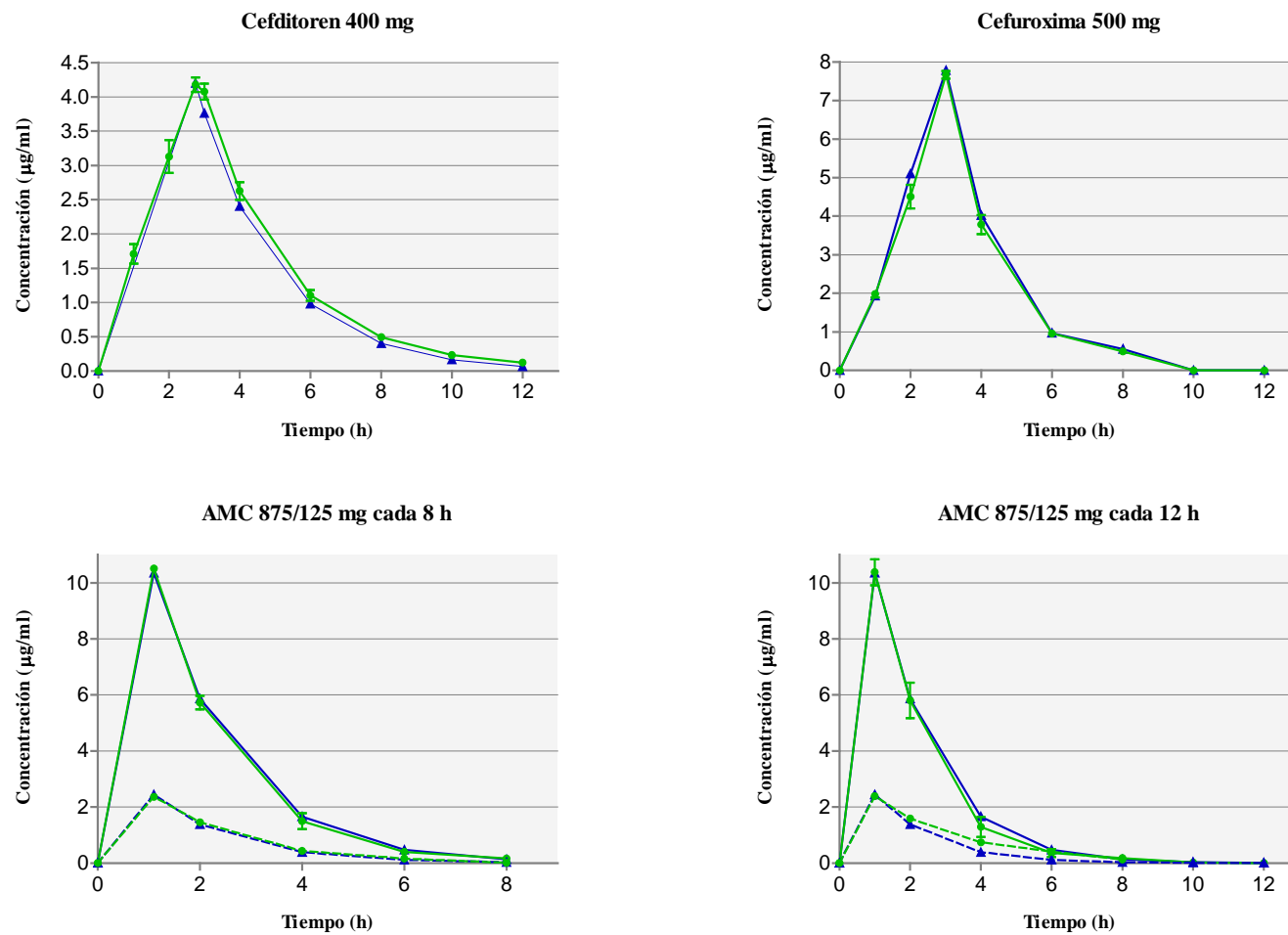
4,2% respectivamente, para una concentración de ácido clavulánico de 0,75 mg/L; y 1,4% y 1%, respectivamente, para una concentración de 3 µg/ml de cefuroxima.

1.2. SENSIBILIDAD *in vitro*

En la Tabla 9 se muestra la sensibilidad de las cepas a los antimicrobianos estudiados. Los valores de CMI obtenidos fueron los mismos antes y después del proceso de simulación. También se exponen los valores del $T_{>CMI}$, el \log_{10} de las UFC/ml y la producción de β -lactamasas (unidades de absorbancia) en los tiempos seleccionados (0, 4, 8, 12 y 24 h).

De acuerdo a los puntos de corte propuestos por el CLSI (Tabla 5), la cepa BLNAS fue sensible a ampicilina (CMI = 0,03 µg/ml), amoxicilina/ácido clavulánico y cefuroxima; la cepa BLPAR fue resistente a ampicilina (CMI = 16 µg/ml) y sensible a amoxicilina/ácido clavulánico y cefuroxima; y las cepas BLNAR y BLPACR fueron resistentes a ampicilina (CMI = 4 µg/ml) y a amoxicilina/ácido clavulánico y sensibles a cefuroxima. No está determinado el punto de corte para cefditoren, pero el valor de CMI más elevado es de 0,12 µg/ml, por lo que se considerarían estas cepas sensibles de acuerdo a los puntos de corte sugeridos por algunos autores (Johnson DM *et al*, 2000; Jones RN *et al*, 1998; Peric M *et al*, 2003).

Figura 5. Concentraciones esperadas (azul) y obtenidas (verde). Para AMC, amoxicilina en línea continua y ácido clavulánico en línea discontinua.



1.3. FARMACODINÁMICA

El $T_{>CMI}$ para cefditoren 400 mg fue $\geq 99\%$ para todas las cepas de *H. influenzae*, independientemente de su fenotipo. Para cefuroxima 500 mg fue del 65% para las cepas BLNAS y BLPAR y del 18% para las cepas portadoras de la mutación N526K en el gen *ftsI*. En el caso de amoxicilina/ácido clavulánico 875 mg administrada cada 8 h fue $\geq 74\%$ para las cepas BLNAS y BLPAR y del 33% para los fenotipos BLNAR y BLPACR. Cuando esta combinación fue administrada cada 12 h el $T_{>CMI}$ disminuyó al 65% y 49% para las cepas BLNAS y BLPAR, respectivamente; y hasta el 22% para las cepas BLNAR y BLPACR (Tabla 9).

1.4. SIMULACIONES FARMACODINÁMICAS

En la figura 6 se muestran las curvas de los controles de crecimiento y los diferentes antibióticos testados frente a las 4 cepas de *H. influenzae*. En las curvas de control de crecimiento (simulaciones sin antibiótico) el inóculo inicial aumentó hasta 8,1–8,4 log₁₀ UFC/ml para las cuatro cepas a las 12 y 24 h, con una actividad de aproximadamente 0,5 unidades de absorbancia para las cepas productoras de β -lactamasas. No se detectó actividad β -lactamasa para las cepas BLNAS y BLNAR en los controles ni en los experimentos.

Tabla 9. CMI, $T_{>CMI}$, \log_{10} UFC/ml y producción de β -lactamasas (unidades de absorbancia) a los tiempos seleccionados.

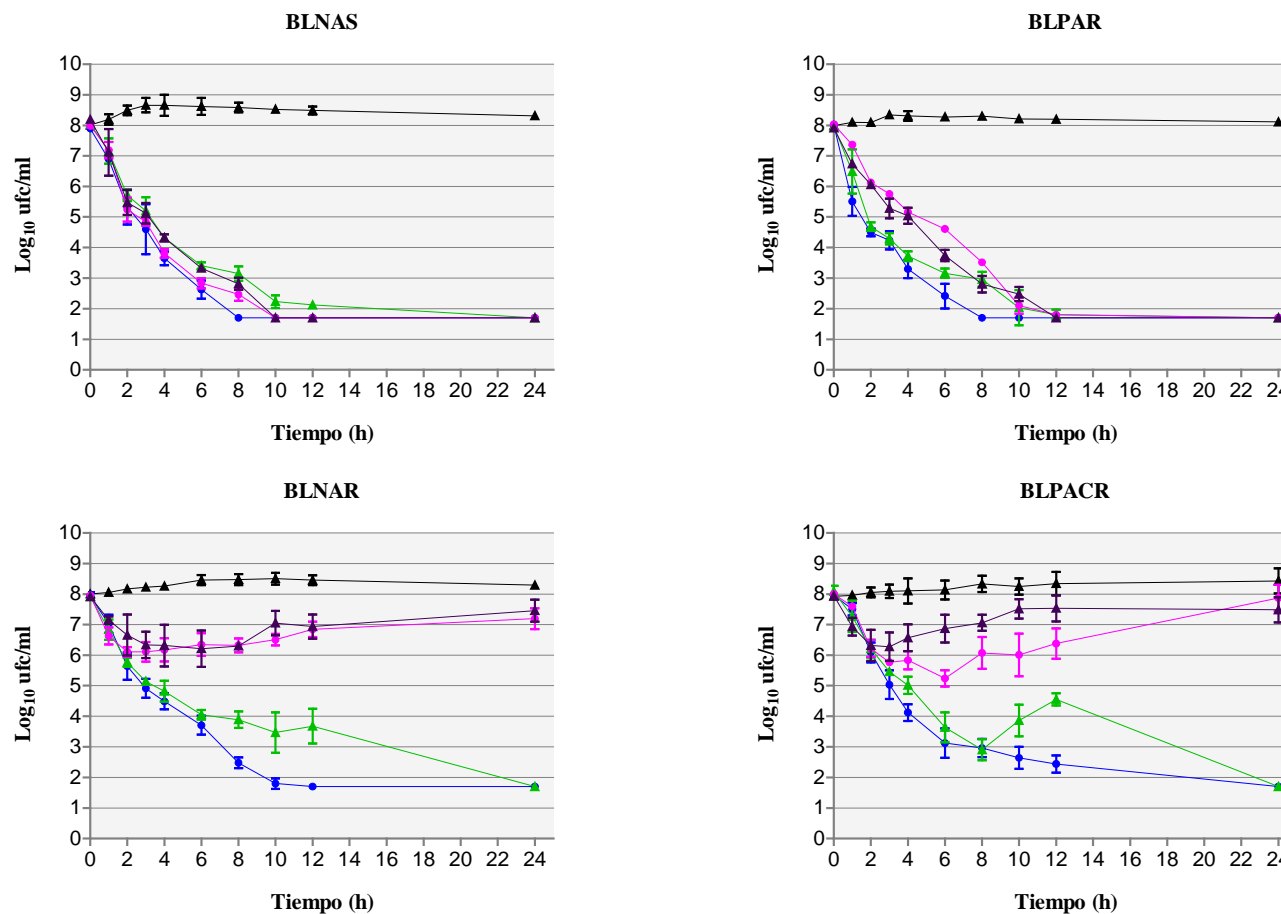
Cepa	CMI (µg/ml)	T _{>CMI} (%)	0h		4h		8h		12h		24 h		
			Log ₁₀	BL	Log ₁₀	BL	Log ₁₀	BL	Log ₁₀	BL	Log ₁₀	BL	
Cefditoren													
BLNAS	0,015	100	7,9 ± 0,0		3,6 ± 0,2		BLD		BLD		BLD		
BLPAR	0,007	100	8,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	3,3 ± 0,3	0,1 ± 0,0	BLD	0,0 ± 0,0	BLD	0,0 ± 0,0	BLD	0,0 ± 0,0	
BLNAR	0,03	100	8,0 ± 0,1		4,5 ± 0,3		2,5 ± 0,2		BLD		BLD		
BLPACR	0,12	99	8,0 ± 0,1	0,3 ± 0,0	4,1 ± 0,3	0,4 ± 0,0	3,0 ± 0,3	0,1 ± 0,1	2,4 ± 0,3	0,0 ± 0,0	BLD	0,0 ± 0,0	
Cefuroxima													
BLNAS	0,5	65	8,0 ± 0,1		4,3 ± 0,1		3,2 ± 0,2		2,1 ± 0,1		BLD		
BLPAR	0,5	65	8,0 ± 0,1	0,2 ± 0,0	3,7 ± 0,2	0,2 ± 0,0	3,0 ± 0,2	0,1 ± 0,0	1,8 ± 0,2	0,0 ± 0,0	BLD	0,0 ± 0,0	
BLNAR	4	18	7,9 ± 0,0		4,8 ± 0,3		3,9 ± 0,3		3,7 ± 0,6		BLD		
BLPACR	4	18	8,0 ± 0,2	0,3 ± 0,0	5,0 ± 0,3	0,4 ± 0,1	2,9 ± 0,3	0,1 ± 0,0	4,5 ± 0,2	0,0 ± 0,0	BLD	0,0 ± 0,0	
AMC 875/125 mg cada 8h													
BLNAS	0,25	98	8,0 ± 0,1		3,8 ± 0,1		2,5 ± 0,2		BLD		BLD		
BLPAR	0,5	74	8,0 ± 0,1	0,3 ± 0,0	5,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	3,5 ± 0,2	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,2	0,0 ± 0,0	BLD	0,0 ± 0,0	
BLNAR	4	33	8,0 ± 0,1		6,2 ± 0,4		6,3 ± 0,2		6,9 ± 0,3		7,2 ± 0,4		
BLPACR	4	33	8,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	5,8 ± 0,3	0,2 ± 0,1	6,1 ± 0,5	0,4 ± 0,1	6,4 ± 0,5	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,2	0,4 ± 0,0	
AMC 875/125 mg cada 12h													
BLNAS	0,25	65	8,2 ± 0,0		4,3 ± 0,1		2,8 ± 0,2		BLD		BLD		
BLPAR	0,5	49	7,9 ± 0,1	0,3 ± 0,0	5,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0	2,8 ± 0,3	0,0 ± 0,0	BLD	0,0 ± 0,0	BLD	0,0 ± 0,0	
BLNAR	4	22	7,9 ± 0,0		6,3 ± 0,9		6,3 ± 0,0		7,0 ± 0,4		7,5 ± 0,4		
BLPACR	4	22	7,9 ± 0,0	0,3 ± 0,0	6,6 ± 0,4	0,2 ± 0,1	7,1 ± 0,3	0,4 ± 0,1	7,5 ± 0,4	0,4 ± 0,0	7,4 ± 0,4	0,4 ± 0,0	

BLD: Bajo el límite de detección; BL: Producción de β -lactamasas.

Frente a las cepas BLNAS (sensible a ampicilina) y BLPAR (resistente a ampicilina y sensible a amoxicilina/clavulánico) no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los cuatro regímenes antibióticos, con reducciones $\geq 6 \log_{10}$ a las 12 h que se mantuvieron hasta el tiempo 24 h. Se observó actividad bactericida (reducción $\geq 3 \log_{10}$) con todas las pautas antibióticas a partir de la hora 4 frente a la cepa BLNAS. Para la cepa BLPAR se observó actividad bactericida a partir de la hora 4 cuando se trató con cefuroxima o cefditoren y a partir de la hora 8 cuando se trató con alguna de las pautas de amoxicilina/ácido clavulánico. Para ambas cepas, el $T_{>CMI}$ fue $\geq 49\%$ del intervalo de dosis para las cuatro regímenes antibióticos. A partir de la hora 8 (hora 12 cuando se trató con cefuroxima) no se detectó la actividad β -lactamasa para la cepa BLPAR.

Para las cepas BLNAR (CMI ampicilina = $16 \mu\text{g/ml}$ y CMI amoxicilina/ácido clavulánico = $4 \mu\text{g/ml}$) y BLPACR (CMI ampicilina y amoxicilina/clavulánico = $4 \mu\text{g/ml}$) se observó actividad bactericida a partir de la hora 4 con cefditoren y cefuroxima. No se detectó una reducción $\geq 3 \log_{10}$ con ninguna de las pautas de amoxicilina/ácido clavulánico en ninguno de los tiempos, observándose recuentos elevados de colonias, $\geq 7 \log_{10}$, a las 24 h. Las reducciones en \log_{10} fueron significativamente mayores para cefditoren y cefuroxima en los tiempos 8, 12 y 24 h frente a las dos pautas de amoxicilina/clavulánico ($p < 0,001$) y para cefditoren frente a cefuroxima a las 12 h ($p < 0,01$). Tras la administración de la primera dosis se obtuvieron reducciones de más de $5 \log_{10}$ con un $T_{>CMI}$ de aproximadamente el 100% para cefditoren, mientras que se observaron resultados variables con un $T_{>CMI} < 35\%$ para los otros antimicrobianos: reducciones pequeñas para ambas pautas de amoxicilina/ácido clavulánico ($\leq 1,6 \log_{10}$) y de 3-4 \log_{10} para cefuroxima con valores del $T_{>CMI}$ de tan sólo el 18%.

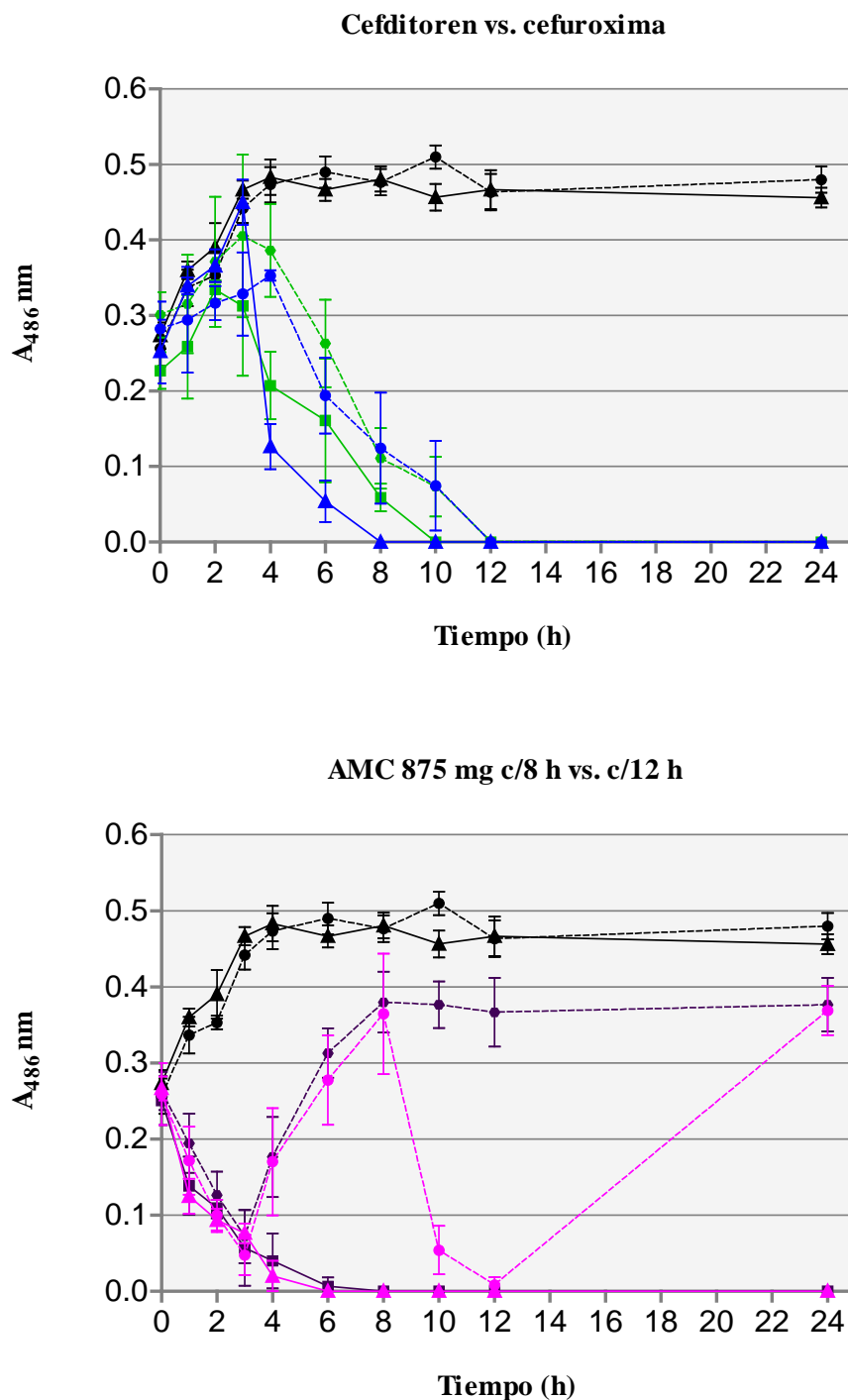
Figura 6. Actividad de cefditoren (azul), cefuroxima (verde), amoxicilina/ácido clavulánico cada 8 h (rosa), amoxicilina/ácido clavulánico cada 12 h (morado) y control de crecimiento para las diferentes cepas (negro).



1.5. ACTIVIDAD β -LACTAMASA

En la Figura 7 se muestra la actividad β -lactamasa (en unidades de absorbancia) para las cepas BLPAR y BLPACR en las simulaciones llevadas a cabo con los diferentes antibióticos y en los controles de crecimiento. Para las cepas BLNAS y BLNAR no se detectó actividad β -lactamasa en los tiempos 0 ni 24. Para la cepa BLPAR no se observó actividad β -lactamasa en los tiempos 12 ni 24 con ninguna de las pautas antibióticas, tiempos en los que esta cepa presentaba reducciones de $>6 \log_{10}$. Para la cepa BLPACR, la actividad β -lactamasa no fue detectable a las 12 ni a las 24 h frente a cefditoren y cefuroxima (antibióticos que mostraban actividad bactericida); mientras que para ambas pautas de amoxicilina/ácido clavulánico alcanzó a las 24 h valores superiores a los del tiempo 0 h ($0,4 \pm 0,0$ unidades de absorbancia, a pesar de no haberse detectado actividad β -lactamasa a las 12 h, para la pauta cada 8 h y $0,4 \pm 0,1$ para la pauta cada 12 h).

Figura 7. Producción de β -lactamasas de las cepas BLPAR (línea continua) y BLPACR (línea punteada) en las simulaciones con cefditoren (azul), cefuroxima (verde), amoxicilina/ácido clavulánico cada 8 h (rosa), amoxicilina/ácido clavulánico cada 12 h (morado) o en las libres de antibiótico (negro).



2. ESTUDIO 2: Evaluación del papel de la unión a proteínas en la actividad de nuevas alternativas frente a los fenotipos de resistencia de *H. influenzae*.

2.1. FARMACOCINÉTICA

Tras llevar a cabo las simulaciones farmacodinámicas con cefditoren 400 mg y amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000/125 mg, se observó que frente a las cepas BLNAS y BLNAR las concentraciones esperadas se ajustaron al patrón determinado por los valores esperados en la curva concentración-tiempo. En cambio, cuando la simulación fue llevada a cabo con la cepa BLPACR, las concentraciones de amoxicilina/ácido clavulánico fueron diferentes a las obtenidas en las simulaciones llevadas a cabo con las cepas no productoras de β -lactamasas, mientras que con cefditoren no se encontraron diferencias en las concentraciones obtenidas entre cepas.

2.1.1. AMC VS. BLNAS Y BLNAR Y CEFDITOREN

La Tabla 10 muestra los parámetros farmacocinéticos, C_{\max} , T_{\max} , $T_{1/2}$ y ABC obtenidos experimentalmente en las simulaciones con las cepas β -lactamasa negativas (BLNAS y BLNAR) y, en el caso de cefditoren, con las tres cepas en estudio. Los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos fueron similares a los parámetros buscados (descritos previamente en Material y Métodos).

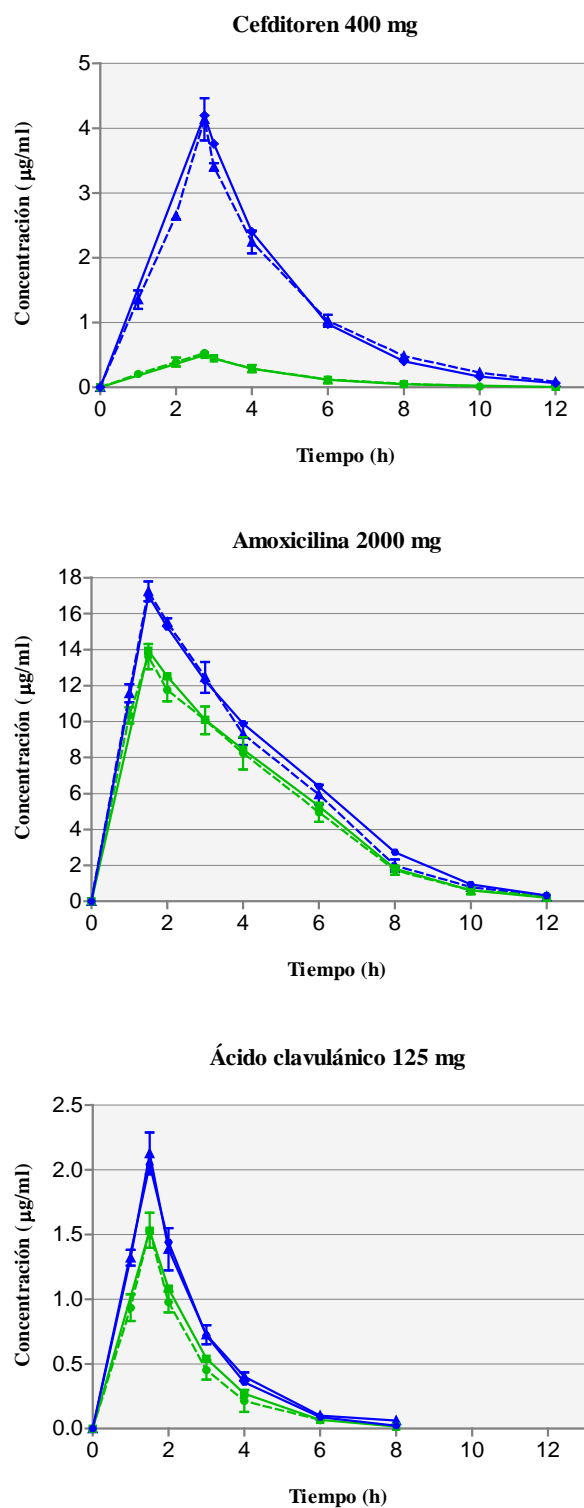
Tabla 10. Media de los parámetros farmacocinéticos obtenidos experimentalmente en las simulaciones con las cepas β -lactamasa negativas para amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000 mg y con todas las cepas para cefditoren 400 mg y desviación estándar.

Parámetros farmacocinéticos	Cefditoren		Amoxicilina		Ácido clavulánico	
	Total	Libre	Total	Libre	Total	Libre
C_{max} (µg/ml) ± DE	4,1 ± 0,3	0,5 ± 0,0	17,2 ± 0,6	13,6 ± 0,7	2,1 ± 0,2	1,5 ± 0,1
T_{max} (h) ± DE	2,8 ± 0,0	2,8 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,0
T_{1/2} (h) ± DE	1,6 ± 0,05	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
ABC₀₋₄₈ (µg/ml·h) ± DE	14,8 ± 0,3	1,9 ± 0,3	73,1 ± 1,2	60,7 ± 3,3	4,7 ± 0,2	2,9 ± 0,1

ABC₀₋₄₈: ABC correspondiente al periodo de simulación.

La Figura 8 muestra las curvas concentración-tiempo para los valores buscados y obtenidos para cefditoren 400 mg en las simulaciones llevadas a cabo frente a los tres fenotipos y amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000/125 mg frente las cepas β -lactamasa negativas, observándose un buen ajuste de los datos obtenidos a los esperados. Los coeficientes de variación intradía e interdía (incluyendo los bioensayos llevados a cabo con los antibióticos administrados frente a la cepa BLPACR) fueron <1% para una concentración de cefditoren de 0,75 µg/ml; ≤3,2% para una concentración de amoxicilina de 0,3 µg/ml y <2,6% para una concentración de ácido clavulánico de 0,75 µg/ml.

Figura 8. Perfiles esperados (línea continua) y obtenidos (línea discontinua) en las simulaciones con las cepas β -lactamasa negativas para AMC y todas las cepas para CDN con las concentraciones totales (azul) y libres (verde).



2.1.2. CEPA BLPACR

Para la cepa BLPACR, productora de β -lactamasas, las concentraciones obtenidas a lo largo de la simulación con cefditoren fueron similares a las esperadas, pero en el caso de amoxicilina/ácido clavulánico las concentraciones de amoxicilina detectadas fueron inferiores a las obtenidas en las simulaciones con las cepas no productoras de β -lactamasas. Las concentraciones alcanzadas en cada uno de los tiempos en las simulaciones con amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000/125 mg para las cepas β -lactamasa negativas y la cepa BLPACR se comparan en la Tabla 11. En la Figura 9 se observa la representación gráfica de los niveles obtenidos para las simulaciones con las cepas β -lactamasa negativas y la cepa BLPACR.

Figura 9. Niveles de amoxicilina totales (azul) y libres (verde) simulados en presencia (cepa BLPACR) (línea continua) y ausencia de β -lactamasas (línea discontinua).

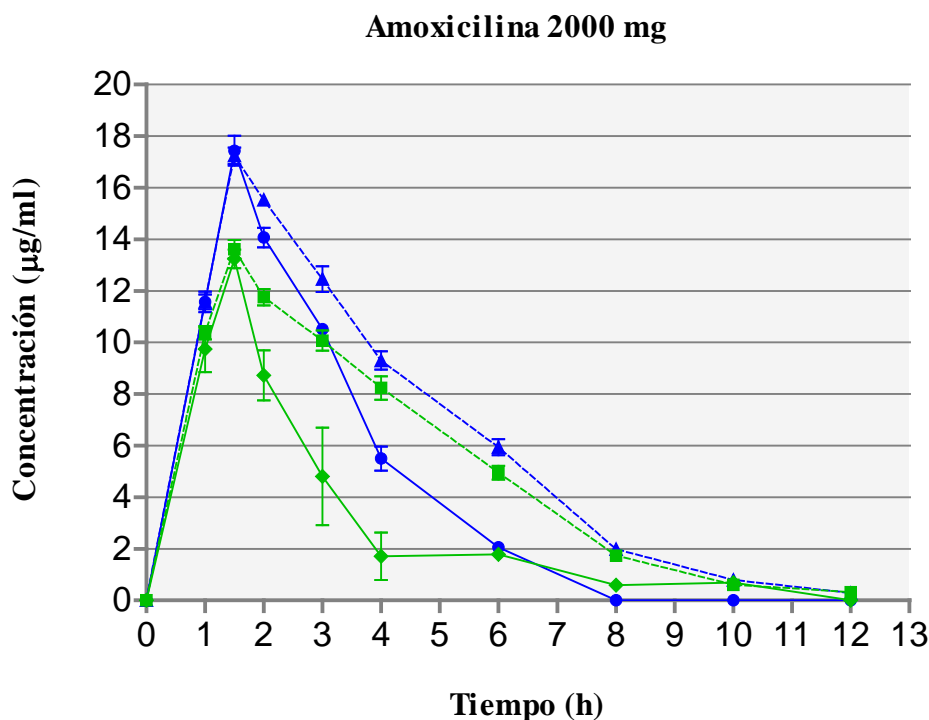


Tabla 11. Concentraciones de amoxicilina y ácido clavulánico y parámetros farmacocinéticos para la cepa BLPACR frente a las β -lactamasa negativas.

Parámetros farmacocinéticos	Amoxicilina				Ácido clavulánico			
	Total		Libre		Total		Libre	
	BLPACR	β -neg	BLPACR	β -neg	BLPACR	β -neg	BLPACR	β -neg
Concentración ($\mu\text{g/ml}$) \pm DE en los tiempos (h)								
1	11,6 \pm 0,6	11,6 \pm 0,5	9,9 \pm 2,2	10,4 \pm 0,5	1,2 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
1,5	17,4 \pm 0,8	17,2 \pm 0,6	13,3 \pm 0,9	13,6 \pm 0,7	2,1 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1
2	14,1 \pm 0,5	15,5 \pm 0,2	7,8 \pm 0,9*	11,8 \pm 0,6	1,5 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
3	10,5 \pm 0,1	12,5 \pm 0,9	2,9 \pm 0,0*	10,1 \pm 0,8	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,4 \pm 0,0	0,5 \pm 0,1
4	5,5 \pm 0,7*	9,3 \pm 0,6	0,8 \pm 0,2*	8,2 \pm 0,9	0,4 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1
6	2,1 \pm 0,2*	5,9 \pm 0,5	<0,03	5,0 \pm 0,5	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
8	<0,03	2,0 \pm 0,3	<0,03	1,7 \pm 0,3	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	<0,03	<0,03
10	<0,03	0,8 \pm 0,0	<0,03	0,6 \pm 0,2	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
12	<0,03	0,3 \pm 0,1	<0,03	0,3 \pm 0,1	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$) \pm DE	17,4 \pm 0,6	17,2 \pm 0,6	13,3 \pm 0,9	13,6 \pm 0,7	2,1 \pm 0,0	2,1 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1
ABC₀₋₄₈ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) \pm DE	48,7 \pm 0,2*	73,1 \pm 1,2	22,5 \pm 2,4*	60,7 \pm 3,3	4,5 \pm 0,0	4,7 \pm 0,0	2,8 \pm 0,2	2,9 \pm 0,1

β -neg: simulaciones con las cepas β -lactamasa negativas; *: $p \leq 0,012$ en las simulaciones frente a las cepas β -lactamasa negativas.

2.2. SENSIBILIDAD *in vitro*

En la tabla 12 se muestran los valores de CMI de las cepas a los antimicrobianos en estudio, así como el $T_{>CMI}$ para las concentraciones totales y libres para cada una de las cepas. Los valores de CMI obtenidos fueron idénticos antes y después de realizar las simulaciones farmacodinámicas.

Aunque no existen puntos de corte propuestos para cefditoren, todas las cepas presentaron una $CMI \leq 0,12 \mu\text{g/ml}$, por lo que se consideraron sensibles a este antibiótico de acuerdo a los puntos de corte propuestos por algunos autores (Johnson DM *et al*, 2000; Jones RN *et al*, 1998; Peric M *et al*, 2003). Para amoxicilina/ácido clavulánico, de acuerdo a los puntos de corte propuestos por el CLSI (R: $\geq 8/4 \mu\text{g/ml}$) (CLSI, 2014) la cepa BLNAS fue sensible y las cepas que portaban la mutación N526K fueron resistentes a dicho antibiótico.

Tabla 12. Valores de CMI de las cepas en estudio y $T_{>CMI}$ calculado en base a la dosis administrada (entre paréntesis en base a las concentraciones obtenidas).

Cepa	Cefditoren 400 mg		AMC LP 2000/125 mg	
	CMI	$T_{>CMI}$ T/L	CMI	$T_{>CMI}$ T/L
BLNAS	0,015	100/100	2	65,4/63,3
BLNAR	0,12	99,3/44,1	8	34,6/28,3
BLPACR	0,06	100/62,5	8	34,6/28,3 (23,3/10,4)

T: concentración total; L: concentración libre.

2.3. FARMACODINÁMICA

En la Tabla 12 también se muestra el $T_{>CMI}$ para las cepas en estudio. Para cefditoren total todas las cepas presentaron un $T_{>CMI} > 99\%$. Cuando se simularon las

concentraciones libres de este antibiótico la cepa BLNAS mantuvo el $T_{>CMI}$ en un 100%, mientras que para las cepas BLNAR y BLPACR descendió al 44,1% y 65,2%, respectivamente. Para amoxicilina/ácido clavulánico (total y libre) el $T_{>CMI}$ esperado fue >60% para la cepa BLNAS y <34% para las cepas BLNAR y BLPACR; pero frente a la cepa BLPACR, productora de β -lactamasas, debido a la disminución de la concentración de amoxicilina, el $T_{>CMI}$ observado fue inferior al esperado.

2.4. SIMULACIONES FARMACODINÁMICAS

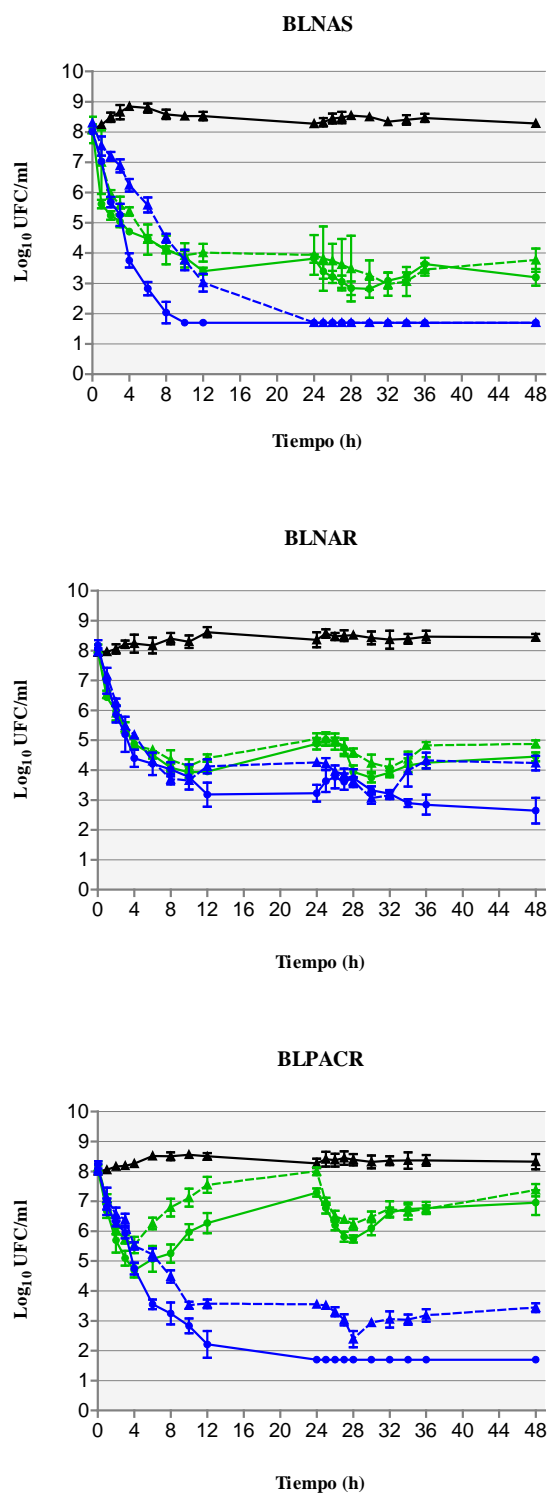
La Tabla 13 muestra la reducción del inóculo inicial (recuento de colonias en \log_{10} a tiempo cero menos recuento de colonias en cada tiempo de obtención de muestra) en las simulaciones con concentraciones totales y libres de cefditoren y amoxicilina/ácido clavulánico frente a las tres cepas estudiadas.

Tabla 13. Media de las reducciones en log₁₀ en las simulaciones con cefditoren y amoxicilina/ácido clavulánico total y libre y desviación estándar.

Fenotipos y antibióticos	Reducciones en log ₁₀ ± DE							
	6 h	8 h	12 h	24 h	28 h	30 h	36 h	48 h
BLNAS								
CDN total	5,2 ± 0,3	6,0 ± 0,4	> 6,3	> 6,3	> 6,3	> 6,3	> 6,3	> 6,3
AMC total	3,6 ± 0,1	4,0 ± 0,0	4,7 ± 0,2	4,3 ± 0,1	5,3 ± 0,2	5,3 ± 0,2	4,5 ± 0,1	4,9 ± 0,2
CDN libre	2,7 ± 0,2	3,8 ± 0,1	5,3 ± 0,3	>6,3	> 6,3	> 6,3	> 6,3	> 6,3
AMC libre	3,6 ± 0,4	4,0 ± 0,3	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,2	4,6 ± 0,3	4,8 ± 0,0	4,6 ± 0,2	4,3 ± 0,2
BLNAR								
CDN total	4,0 ± 0,5	4,2 ± 0,4	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,4	4,5 ± 0,5	4,9 ± 0,1	5,3 ± 0,5	5,5 ± 0,6
AMC total	3,5 ± 0,2	3,9 ± 0,1	4,0 ± 0,1	3,1 ± 0,3	4,1 ± 0,3	4,3 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,1
CDN libre	3,7 ± 0,1	4,3 ± 0,3	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,0	4,3 ± 0,2	4,9 ± 0,3	3,6 ± 0,3	3,7 ± 0,3
AMC libre	3,4 ± 0,3	3,7 ± 0,5	3,7 ± 0,3	3,0 ± 0,3	3,5 ± 0,3	3,8 ± 0,4	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,3
BLPACR								
CDN total	4,7 ± 0,2	5,0 ± 0,3	6,0 ± 0,5	> 6,3	> 6,3	> 6,3	> 6,3	> 6,3
AMC total	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,4	1,8 ± 0,5	0,8 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,5
CDN libre	2,9 ± 0,3	3,6 ± 0,0	4,5 ± 0,3	4,5 ± 0,2	5,7 ± 0,4	5,1 ± 0,2	5,0 ± 0,4	4,6 ± 0,1
AMC libre	1,9 ± 0,3	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,1 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,4 ± 0,2	0,8 ± 0,4

CDN: cefditoren; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico.

Figura 10. Contaje de colonias a lo largo de 48h en las simulaciones libres de antibiótico (negro), cefditoren total (línea azul continua), cefditoren libre (línea azul discontinua), amoxicilina/ácido clavulánico total (línea verde continua), y amoxicilina/ácido clavulánico libre (línea verde discontinua).



La Figura 10 muestra el recuento de colonias a lo largo del tiempo en las simulaciones llevadas a cabo con concentraciones totales y libres para ambos antibióticos, así como en las simulaciones sin antibiótico para cada una de las cepas. Se obtuvo actividad bactericida frente a la cepa BLNAS a partir de la hora 6 tras iniciar el tratamiento con cefditoren y amoxicilina/ácido clavulánico tanto con las concentraciones totales como libres. Sin embargo, se obtuvieron reducciones significativamente mayores para cefditoren total y libre ($>6,3 \log_{10}$) a las 12, 24, 36, y 48 h frente a las dos concentraciones de amoxicilina/ácido clavulánico ($p<0,001$).

Frente a la cepa BLNAR, se obtuvo actividad bactericida (reducción $\geq 3 \log_{10}$) a partir de la hora 6 con ambos antimicrobianos y concentraciones. Se observó una reducción significativamente mayor ($p<0,001$) con cefditoren total (pero no libre) a los tiempos 24, 36 y 48 h frente a ambas concentraciones de amoxicilina/ácido clavulánico.

Frente a la cepa BLPACR, cefditoren total mostró actividad bactericida a partir de la hora 6, y la concentración libre a partir de la hora 8. Cuando se trató con amoxicilina/ácido clavulánico no se alcanzó actividad bactericida a lo largo del tratamiento. De este modo, en los tiempos 12, 24, 36 y 48 h dicha actividad fue significativamente mayor ($p<0,001$) para ambas concentraciones de cefditoren que la obtenida tratando con amoxicilina/ácido clavulánico.

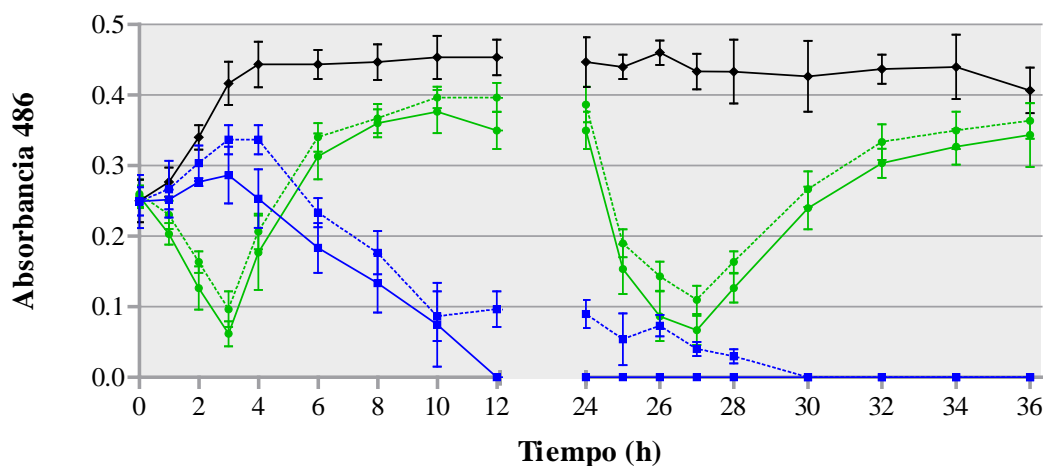
Cuando se exploró la actividad a las 6 horas de haber iniciado el tratamiento (actividad bactericida temprana ya que supone el 50% del primer intervalo de dosis), no se encontraron diferencias significativas entre cefditoren libre y amoxicilina/ácido clavulánico frente a la cepa BLNAS ($p=0,02$) y la cepa BLNAR ($p=0,14$); pero sí se

apreciaron diferencias significativas frente a la cepa BLPACR ($p=0,011$) a favor de cefditoren.

2.5. ACTIVIDAD β -LACTAMASA

Para las cepas BLNAS y BLNAR no se detectó actividad β -lactamasa en los tiempos 0 y 24. En la Figura 11 se muestra la actividad β -lactamasa (en unidades de absorbancia) de la cepa BLPACR en las simulaciones libres de antibiótico y en las simulaciones con las concentraciones totales y libres de los antimicrobianos estudiados.

Figura 11. Actividad β -lactamasa (en unidades de absorbancia) de la cepa BLPACR en las simulaciones con cefditoren total (línea verde continua), cefditoren libre (línea verde discontinua), amoxicilina/ácido clavulánico total (línea azul continua), y amoxicilina/ácido clavulánico libre (línea azul discontinua) frente a las simulaciones libres de antibiótico (línea negra).



La actividad β -lactamasa en las simulaciones libres de antibiótico fue $>0,4$ unidades de absorbancia a partir de la hora 3. En las simulaciones con cefditoren disminuyó hasta valores indetectables desde la hora 12 en adelante para la concentración

total y desde la hora 30 para la concentración libre. La actividad β -lactamasa en las simulaciones con amoxicilina/ácido clavulánico total y libre disminuyó dentro de las 4 primeras horas tras administrar la dosis, pero aumentó a valores de absorbancia de casi 0,4 unidades a los tiempos 12, 24, 36, y 48 h; valores similares a los obtenidos en las simulaciones llevadas a cabo sin antibiótico. El recuento de colonias (Figura 10) en las simulaciones con amoxicilina/ácido clavulánico frente a la cepa BLPACR aumentó en paralelo con el incremento de la actividad β -lactamasa desde la hora 4 en adelante (Figura 11).

El incremento en el recuento de colonias de la cepa BLPACR pero no de la BLNAR, cuando ambas muestran el mismo $T_{>CMI}$ experimental (calculado con las concentraciones determinadas en simulaciones con las cepas β -lactamasa negativas, Tabla 12), fue debido a las concentraciones significativamente más bajas de amoxicilina ($p \leq 0,012$) desde la hora 4 en adelante para la concentración total y desde la hora 2 para la concentración libre (Tabla 11).

En consecuencia, la presencia de actividad β -lactamasa conduce a una ABC_{0-48} significativamente menor en las simulaciones con la cepa BLPACR frente a las simulaciones con las cepas β -lactamasa negativas (Tabla 11) y a un pronunciado descenso en el $T_{>CMI}$ para amoxicilina/ácido clavulánico (de 34,6% a 23,3% en las simulaciones con concentraciones totales; y de 28,3% a 10,4% en las simulaciones con concentraciones libres) para la cepa BLPACR (Tabla 12). No se encontraron diferencias entre las dos concentraciones de cefditoren a lo largo del tiempo al comparar la cepa BLPACR frente a las cepas β -lactamasas negativas.

3. ESTUDIO 3: Actividad de diferentes β -lactámicos sobre una población polimicrobiana formada por aislados comunes del tracto respiratorio.

3.1. FARMACOCINÉTICA

La Tabla 14 muestra las concentraciones y los parámetros farmacocinéticos experimentalmente medidos en el compartimento periférico en las simulaciones sin bacteria y en las realizadas con el inóculo mixto. Para cefditoren y ácido clavulánico no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$), en las concentraciones detectadas para cada uno de los tiempos en las simulaciones sin bacteria, las llevadas a cabo con el inóculo mixto y las concentraciones buscadas.

En contraste, las concentraciones de amoxicilina obtenidas al realizar la simulación con el inóculo mixto fueron significativamente diferentes al compararlas frente a las buscadas y a las realizadas sin bacteria. En las simulaciones con amoxicilina 875 mg (donde la amoxicilina no está protegida por el ácido clavulánico) estas diferencias se observaron en los tiempos 1,5 ($p = 0,0008$) y 2 h ($p = 0,0025$), así como en los tiempos 4, 6 y 8 si se asume una concentración igual al límite de detección de $0,06 \mu\text{g/ml}$; lo que supuso un descenso significativo en los parámetros farmacocinéticos esperados: la C_{max} descendió de $9,06$ a $5,11 \mu\text{g/ml}$, el ABC de $20,13$ a $5,61 \mu\text{g/ml} \times \text{h}$, y la $T_{1/2}$ de $1,08$ a $0,40$ h.

En las simulaciones con amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg, a pesar de la presencia del ácido clavulánico se detectaron concentraciones de amoxicilina significativamente menores en las simulaciones llevadas a cabo con el inóculo mixto desde la hora 4 a la 8 ($p < 0,0001$), donde las diferencias en los parámetros

farmacocinéticos no fueron significativas excepto para el valor de la $T_{1/2}$ (1,16 h *versus* 0,80 h).

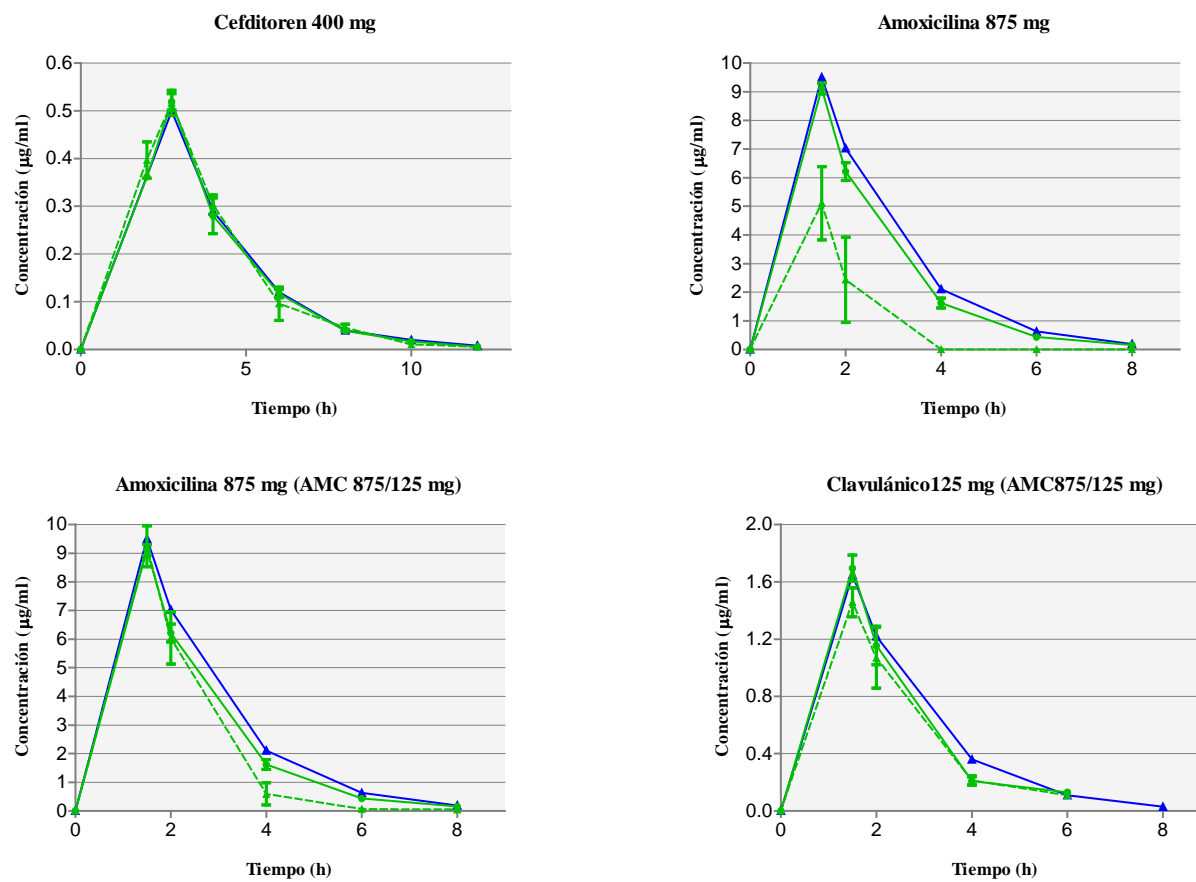
La Figura 12 muestra las curvas concentración-tiempo para los valores observados y obtenidos de las concentraciones libres de cefditoren 400 mg, amoxicilina 875 mg y amoxicilina/ácido clavulánico 875 mg en las simulaciones llevadas a cabo con el compartimento periférico sin infectar (control farmacocinético) o infectado con el inóculo mixto a lo largo de 24 h. Se observó un buen ajuste de los datos para cefditoren y ácido clavulánico, mientras que para amoxicilina (sola o en combinación con ácido clavulánico) se observó una mala correlación entre las concentraciones obtenidas en las simulaciones llevadas a cabo con el inóculo mixto y las buscadas. Los coeficientes de variación intradía e interdía fueron 1,97% y 1,97% para cefditoren; 2,54% y 2,25 para amoxicilina, y 3,68% y 2,02% para ácido clavulánico, respectivamente.

Tabla 14. Concentraciones libres y parámetros farmacocinéticos buscados y observados.

T (h)	Cefditoren 400 mg			Ácido clavulánico 125 mg			Amoxicilina 875 mg				
	B	S _{LB}	S _{IM}	B	S _{LB}	S _{IM}	B	Amox		AMC	
								S _{LB}	S _{IM}	S _{LB}	S _{IM}
T_{max}^a	0,50	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,03	1,65	1,70 ± 0,09	1,46 ± 0,11	9,51	9,05±0,19	5,11 ± 1,27 ^b	9,17 ± 0,24	9,24 ± 0,71
2	-	0,36 ± 0,00	0,40 ± 0,04	1,22	1,15 ± 0,13	1,07 ± 0,21	7,03	6,30±0,51	2,43 ± 1,49 ^b	6,12 ± 0,09	6,04 ± 0,91
4	0,29	0,28 ± 0,04	0,30 ± 0,02	0,36	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,03	2,11	0,174±0,00	BLD ^b	1,50 ± 0,17	0,59 ± 0,39 ^b
6	0,12	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,11	0,13 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,63	0,45±0,03	BLD ^b	0,41 ± 0,05	0,06 ± 0,02 ^b
8	0,04	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,03	BDL	BDL	0,19	0,13±0,03	BLD ^b	0,17 ± 0,02	0,04 ± 0,01 ^B
10	0,02	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
C_{max} (µg/ml)	0,50	0,52 ± 0,02	0,52 ± 0,03	1,65	1,70 ± 0,09	1,46 ± 0,10	9,51	9,06 ± 0,19	5,11 ± 1,27 ^b	9,17 ± 0,24	9,24 ± 0,71
ABC₀₋₂₄ (µg/ml·h)	1,79	1,76 ± 0,05	1,79 ± 0,10	3,91	3,26 ± 0,09	2,86 ± 0,40	22,59	20,13 ± 0,52	5,61 ± 1,71 ^b	19,76 ± 0,91	15,90 ± 1,59
T_{1/2} (h)	1,55	1,49 ± 0,06	1,48 ± 0,07	1,15	0,99 ± 0,31	1,03 ± 0,17	1,15	1,08 ± 0,09	0,40 ± 0,06 ^b	1,16 ± 0,03	0,80 ± 0,03 ^b

B: valores buscados; S_{LB}: valores determinados en las simulaciones libres de bacteria; S_{IM}: valores obtenidos en las simulaciones con inóculo mixto; BLD: Bajo el límite de detección. ^a T_{max}: cefditoren 2,75 h; amoxicilina y ácido clavulánico 1,5 h. ^b p<0,01 *versus* S_{LB}.

Figura 22. Perfiles esperados (azul) y obtenidos (verde) en las simulaciones libres de bacteria (línea continua) y con el inóculo mixto (línea discontinua).



3.2. SENSIBILIDAD *in vitro*

La Tabla 15 muestra la sensibilidad *in vitro* (CMI_s determinadas siguiendo las recomendaciones del CLSI) de las cepas estudiadas a los antibióticos usados en este estudio. Las CMI_s determinadas en THSB (el medio de cultivo empleado en las simulaciones) fueron las mismas que aquellas obtenidas al realizarlas en el medio de cultivo recomendado por el CLSI, excepto para la cepa BLPACR y cefditoren y la cepa BLPAR y amoxicilina/ácido clavulánico, donde dichas CMI_s fueron una dilución menor. De acuerdo a los puntos de corte propuestos por el CLSI (CLSI, 2014), *S. pyogenes* fue sensible a todos los antibióticos con una CMI $\leq 0,03$ µg/ml, *S. pneumoniae* fue sensible a amoxicilina con o sin ácido clavulánico (CMI = 2 µg/ml), y aunque no están establecidos los puntos de corte para cefditoren, las cepas de *H. influenzae* y *S. pyogenes* pueden ser clasificadas como sensibles y la cepa de *S. pneumoniae* como resistente intermedia (Johnson DM *et al*, 2000; Jones RN *et al*, 1998; Peric M *et al*, 2003). Ambas cepas de *H. influenzae* fueron resistentes a amoxicilina. La cepa BLPAR fue sensible y la cepa BLPACR fue resistente a amoxicilina/ácido clavulánico.

3.3. FARMACODINÁMICA

En la Tabla 15 también se muestra el $T_{>CMI}$ calculado con las concentraciones determinadas en las simulaciones llevadas a cabo sin bacteria y con el inóculo mixto. Se obtuvieron valores similares en ambos casos para cefditoren 400 mg con un $T_{>CMI} > 55\%$ para *H. influenzae* y *S. pyogenes*, y en torno a un 25% para *S. pneumoniae*. En

las simulaciones con amoxicilina 875 mg, donde el ácido clavulánico no está presente para proteger este antibiótico frente a las β -lactamasas, se obtuvieron valores insignificantes del $T_{>CMI}$ para las cepas productoras de β -lactamasas, y éste descendió cuando comparamos las simulaciones sin bacteria frente a las realizadas con el inóculo mixto de 43,2% a 17,7% (*S. pneumoniae*) y de 99,9% a 24,9% (*S. pyogenes*) en el caso de las cepas grampositivas. Finalmente, para amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg, se obtuvieron valores insignificantes del $T_{>CMI}$ frente a la cepa BLPACR y los valores para la cepa BLPAR y *S. pneumoniae* descendieron de 40,8% a 32,8% al comparar las simulaciones sin bacteria frente a las realizadas con el inóculo mixto (debido a la producción de β -lactamasas); y para *S. pyogenes* fue cercano al 100% del intervalo de dosis.

Tabla 15. Sensibilidad *in vitro* (CMI en $\mu\text{g/ml}$) y $T_{>CMI}$ (% del intervalo de dosis) en las simulaciones libres de bacteria (S_{LB}) y simulaciones con el inóculo mixto (S_{IM}).

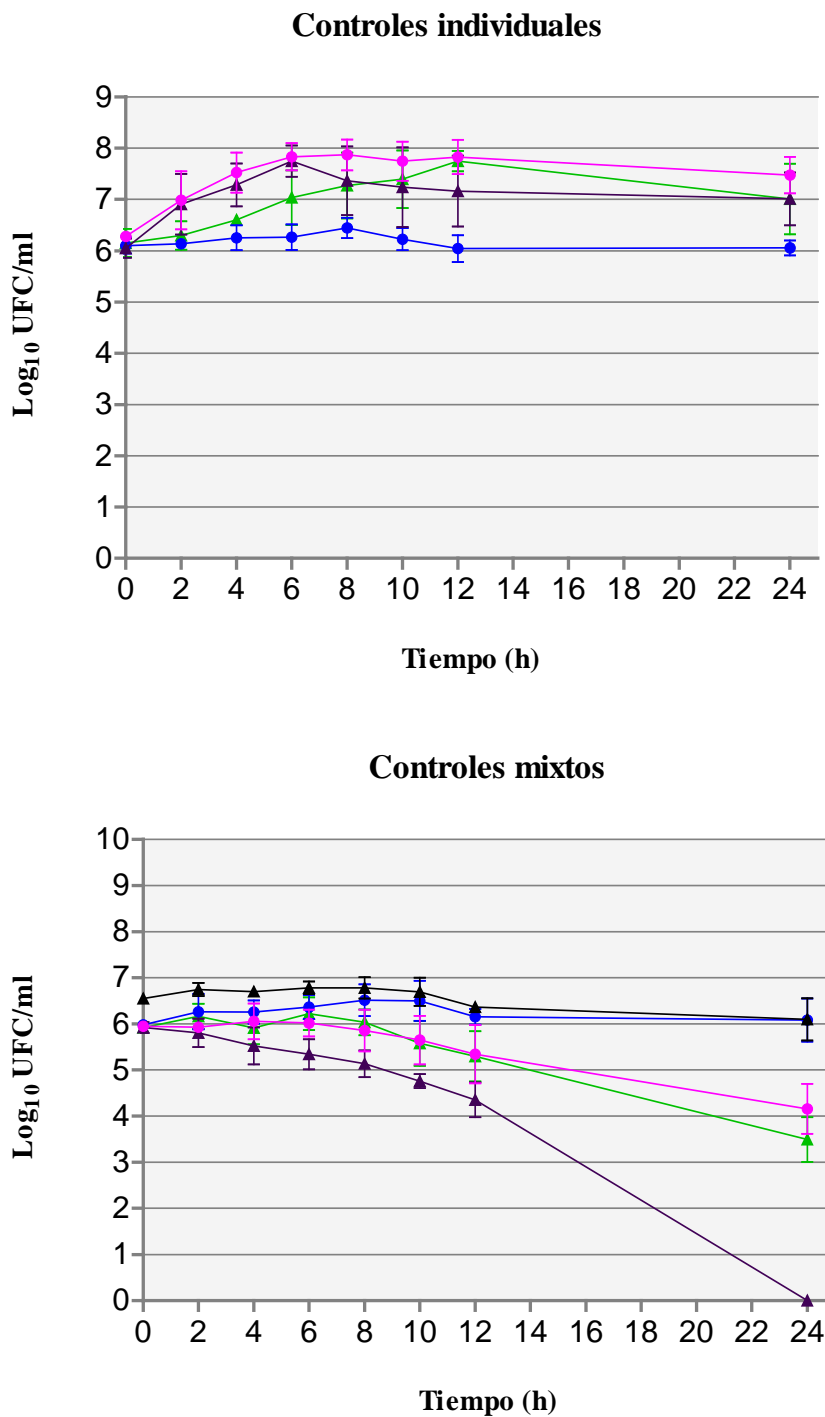
Cepas	Cefditoren			Amoxicilina			AMC		
	CMI	$T_{>CMI}$		CMI	$T_{>CMI}$		CMI	$T_{>CMI}$	
		S_{LB}	S_{IM}		S_{LB}	S_{IM}		S_{LB}	S_{IM}
<i>S. pyogenes</i>	0,015	84,3	79,0	0,03	99,9	24,9	0,03	99,9	99,9
<i>S. pneumoniae</i>	0,25	24,0	25,6	2	43,2	17,7	2	40,8	32,8
BLPAR	0,06	57,4	58,0	>16	0,0	0,0	2	40,8	32,8
BLPACR	0,06	57,4	58,0	>16	0,0	0,0	8	4,5	4,6

3.4. FITNESS EN LAS SIMULACIONES LIBRES DE ANTIBIÓTICO

En la Figura 13 se muestra la viabilidad en THS a lo largo del tiempo en las simulaciones sin antibiótico con cultivos individuales y mixtos. En los cultivos individuales la media del recuento de colonias aumenta $\geq 1 \log_{10}$ UFC/ml desde el tiempo 0 hasta el 12 y 24 en todas las cepas excepto en *S. pyogenes* donde el recuento de colonias fue similar en los tiempo 0, 12 y 24 ($6,05 \log_{10}$ UFC/ml).

La situación fue completamente diferente en las simulaciones con el inóculo mixto. La media del recuento de colonias en \log_{10} se mantuvo a lo largo del tiempo ($6,55 \log_{10}$ en el tiempo 0; $6,37 \log_{10}$ en el 12 y $6,10 \log_{10}$ en el 24), aunque la distribución de la población bacteriana varió ampliamente si consideramos el porcentaje de UFC/ml de cada cepa a lo largo de 24 h (Figura 15). En el tiempo 0, cada cepa formaba aproximadamente el 25% del inóculo mixto, y en el tiempo 24 el 96,3% de la población correspondió a *S. pyogenes*, con pequeñas poblaciones de la cepa BLPACR (3,17%) y *S. pneumoniae* (0,50%), y con la cepa BLPAR presentando un recuento de colonias inferior al límite de detección.

Figura 13. Recuento de colonias de las cepas de *S. pyogenes* (azul), *S. pneumoniae* (verde), BLPAR (morada) y BLPACR (rosa), en las simulaciones libres de antibiótico con los inóculos individuales y mixtos (población total en negro).



3.5. SIMULACIONES CON ANTIBIÓTICO E INÓCULO MIXTO

En la Figura 14 se muestra el recuento de colonias a lo largo del periodo de simulación para cada uno de los tratamientos ensayados. Cuando las simulaciones fueron llevadas a cabo con cefditoren 400 mg se obtuvo una reducción del inóculo mixto inicial del 98,5% ($<2 \log_{10}$ UFC/ml) a las 24 h, pero no se obtuvieron reducciones cuando los antibióticos empleados fueron amoxicilina 875 mg o amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg. La reducción proporcionada por cefditoren se debió a la desaparición de la población de *S. pyogenes* en la hora 6 ($T_{>CMI}$ 79%) y de las poblaciones de *H. influenzae* en la hora 12 ($T_{>CMI}$ 58%), así como a un descenso del 94% en la población inicial de *S. pneumoniae* a las 24 h ($T_{>CMI} \approx 25\%$).

En las simulaciones con amoxicilina, el mantenimiento o leve descenso de las cepas de *H. influenzae* ($T_{>CMI} = 0\%$) da lugar a la ausencia de la reducción del inóculo mixto inicial a las 24 h. *S. pneumoniae* descendió sólo 0,49 \log_{10} , probablemente debido al descenso en el $T_{>CMI}$ desde el 43,2% en las simulaciones sin bacteria hasta el 17,7% en las simulaciones con inóculo mixto, a causa de la producción de β -lactamasas y la consecuente inactivación de la amoxicilina, como se muestra en la Tabla 1 (concentraciones significativamente más bajas en las simulaciones con inóculo mixto frente a las simulaciones sin bacteria). Esta inactivación también afecta a la actividad frente a *S. pyogenes*, y el régimen de amoxicilina fue el único incapaz de erradicar esta cepa (aunque produjo una reducción de 1,2 \log_{10} , debido a la reducción en el $T_{>CMI}$ desde un 99,9% a un 24,9% cuando comparamos las simulaciones libres de bacteria frente a las simulaciones con inóculo mixto).

En las simulaciones llevadas a cabo con amoxicilina/ácido clavulánico se mantuvo constante la población de la cepa BLPAR ($T_{>CMI} = 32,8\%$), y la cepa BLPACR aumentó $0,5 \log_{10}$ ($T_{>CMI}$ de tan sólo el $4,6\%$) lo que dio lugar a la ausencia de reducción del inóculo mixto inicial. *S. pneumoniae* disminuyó $0,94 \log_{10}$ ($T_{>CMI} = 32,8\%$) y *S. pyogenes* fue indetectable a partir de la hora 10 ($T_{>CMI} = 99,9\%$).

Figura 14. Recuento de colonias de las cepas de *S. pyogenes* (azul), *S. pneumoniae* (verde), BLPAR (morada) y BLPACR (rosa), en las simulaciones libres de antibiótico con los inóculos individuales y mixtos (población total en negro).

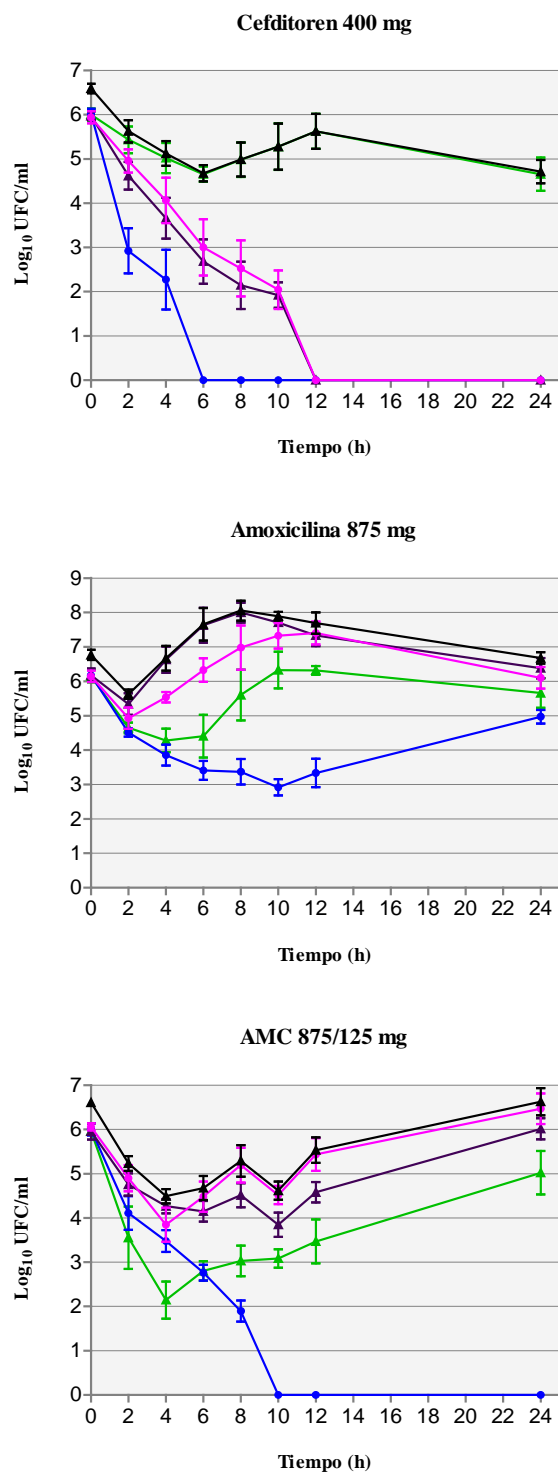
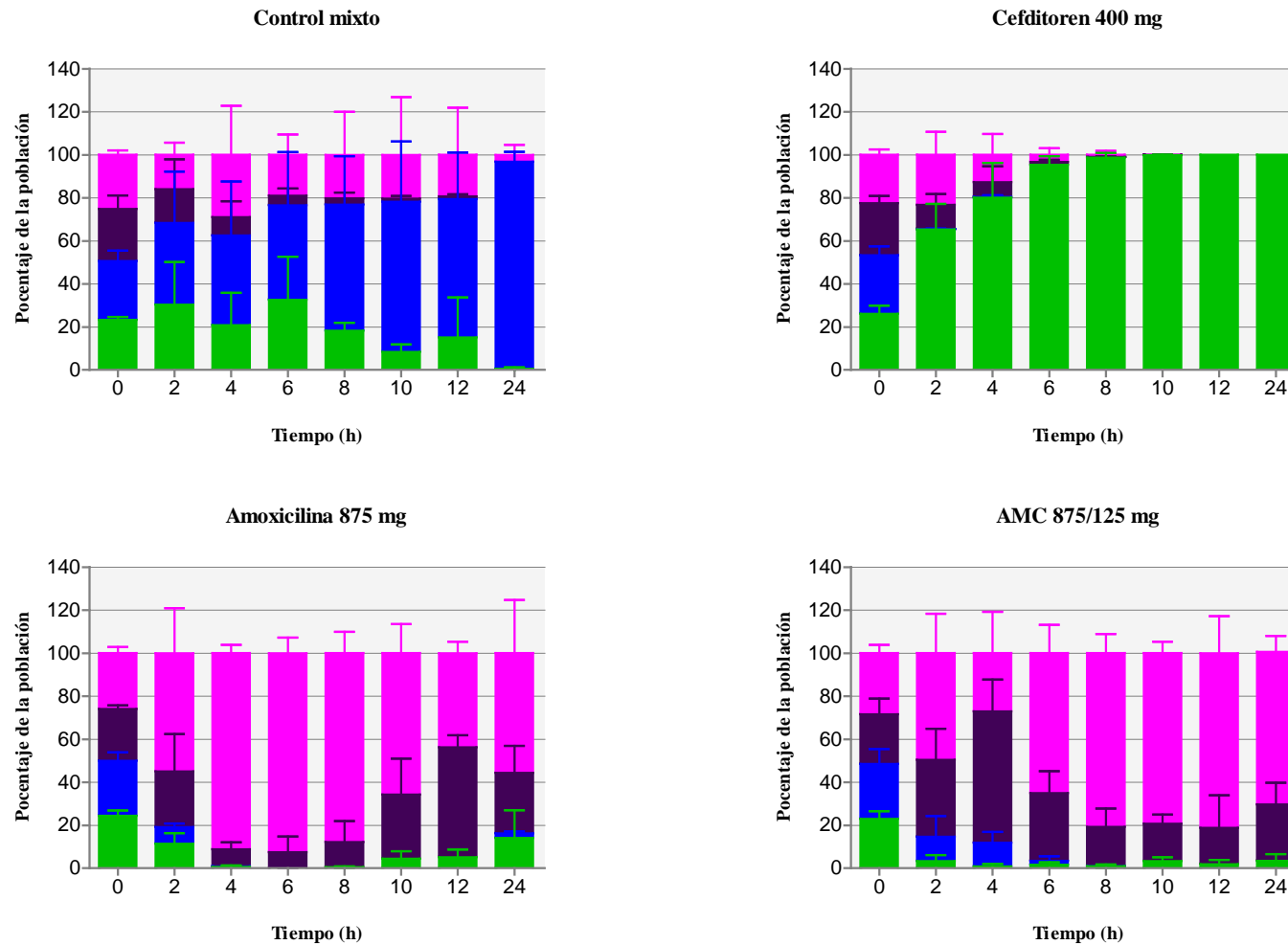


Figura 15. Porcentajes de cada cepa (*S. pyogenes* en azul, *S. pneumoniae* en verde, BLPAR en morado y BLPACR en rosa) en los tratamientos y el control mixto.



3.6. ACTIVIDAD β -LACTAMASA

La Tabla 16 muestra la actividad β -lactamasa a lo largo de 24 h en las simulaciones llevadas a cabo con los antimicrobianos a estudiar. No se encontraron diferencias significativas entre los 3 regímenes antibióticos hasta la hora 6, cuando la actividad β -lactamasa fue mayor para amoxicilina frente a amoxicilina/ácido clavulánico. Estas diferencias también se detectaron en los tiempos 10 y 12, lo que puede relacionarse con las diferentes poblaciones de las cepas productoras de β -lactamasas encontradas en ambas simulaciones en estos tiempos: aproximadamente $7,5 \log_{10}$ en las simulaciones con amoxicilina y en torno a $4-5 \log_{10}$ en las simulaciones con amoxicilina/ácido clavulánico.

En las simulaciones con cefditoren, en los tiempos 10 y 12, la actividad β -lactamasa fue similar a la determinada en las simulaciones con amoxicilina. Cefditoren fue muy activo frente a las dos cepas de *H. influenzae*, y la lisis de estos organismos (contaje en estos tiempos ≤ 100 UFC/ml) probablemente produjo la liberación de la enzima responsable de la elevada actividad β -lactamasa determinada. A las 24 h se detectó una actividad β -lactamasa menor (0,05 unidades de absorbancia) (recuento de colonias de *H. influenzae* por debajo del límite de detección) frente a las simulaciones con amoxicilina con o sin ácido clavulánico (0,20 unidades de absorbancia, un valor similar al observado en el tiempo 0), en las que el recuento de colonias fue superior al obtenido en el inóculo inicial.

Tabla 16. Actividad β -lactamasa.

Tiempo	Cefditoren	Amoxicilina	AMC
0	0,21 \pm 0,00	0,21 \pm 0,00	0,24 \pm 0,00
T _{max}	0,11 \pm 0,10	0,06 \pm 0,03	0,02 \pm 0,03
2	0,06 \pm 0,07	0,09 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00
4	0,18 \pm 0,13	0,17 \pm 0,03	0,05 \pm 0,00
6	0,21 \pm 0,08	0,36 \pm 0,11	0,10 \pm 0,00 ^b
8	0,31 \pm 0,11	0,23 \pm 0,04	0,14 \pm 0,00
10	0,23 \pm 0,11	0,17 \pm 0,06	0,02 \pm 0,02 ^c
12	0,24 \pm 0,05	0,30 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01 ^c
24	0,05 \pm 0,02 ^d	0,19 \pm 0,06	0,20 \pm 0,01

T_{max}: 2,8 h para cefditoren, 1,5 h para amoxicilina y ácido clavulánico. ^bp<0,01 AMC *versus* AML; ^cp<0,01 AMC *versus* AML y CDN; ^dp<0,01 CDN *versus* AML y AMC.

Discusión

Tras el desarrollo de la vacuna frente a Hib se ha producido un descenso significativo de la enfermedad invasiva causada por este microorganismo en aquellos países en los que ésta ha sido implantada, pero *H. influenzae* sigue siendo un agente clave en las infecciones del tracto respiratorio superior e inferior en humanos (su único hospedador natural). El tratamiento de las enfermedades respiratorias se ha visto complicado a lo largo de la última década debido a los cambios en la ecología de *H. influenzae* con respecto a los fenotipos de resistencia: en suma a la ya clásica resistencia a ampicilina presentada por el fenotipo BLPAR (el cual se ha relacionado con el consumo de antibióticos) (Gómez J *et al*, 1994; Nissinen A *et al*, 1995) se ha producido la aparición y diseminación de la resistencia a amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico en las cepas no productoras de β -lactamasas resistentes a ampicilina (BLNAR) y las cepas β -lactamasa positivas resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico (BLPACR) (García-Cobos S *et al*, 2008; Sevillano D *et al*, 2009; Dabernat H & Delmas C, 2012). Genotípicamente, las cepas que presentan el fenotipo BLNAR se caracterizan por la presencia de mutaciones en el gen *ftsI*, mientras que las cepas con fenotipo BLPACR combinan este mecanismo de resistencia junto con la producción de β -lactamasas, siendo estas enzimas similares a las encontradas en el fenotipo BLPAR con una elevada prevalencia de la enzima TEM-1.

El incremento en la prevalencia de los fenotipos BLNAR y BLPACR observado a lo largo de los últimos años (Dabernat H & Delmas C, 2012; García-Cobos S *et al*, 2008; Ito M *et al*, 2010; Park C *et al*, 2013) conlleva un aumento de la resistencia a amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y diferentes cefalosporinas (Ubukata K *et al* 2001; Osaki Y *et al*, 2005), lo que muestra importantes implicaciones en el tratamiento de las infecciones respiratorias en la comunidad donde el agente

causal no se suele identificar. De hecho, el CLSI recomienda que las cepas BLNAR sean consideradas resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefaclor, cefamandol, cefetamet, cefonicid, cefprozil, cefuroxima, loracarbef, y piperacilina/tazobactam, a pesar de su posible sensibilidad *in vitro* (CLSI, 2014). Además, las cepas BLPACR generalmente se muestran resistentes a ampicilina y menos sensibles a cefaclor, cefprozil, loracarbef cefuroxima, que las cepas BLPAR (Doern GV *et al*, 1997; Jones RN *et al*, 1997).

Además del aumento en la prevalencia en los fenotipos BLNAR y BLPACR y el consecuente aumento de la resistencia a β -lactámicos, se ha observado que las cepas con una CMI a ampicilina de 1 μ g /ml (sensibles según los criterios del CLSI y la BSAC) deben ser interpretadas con precaución debido a que pueden ser portadoras de mutaciones en el gen *ftsI* (García-Cobos S *et al*, 2007; Sevillano D *et al*, 2009) y, como se vio en un estudio previo, la prevalencia de los fenotipos de resistencia BLNAR y BLPACR con sensibilidad disminuida a aminopenicilinas se está incrementando (Sevillano D *et al*, 2008). Por otro lado, en infecciones causadas por estas cepas cuyo tratamiento se realiza con ampicilina o amoxicilina, particularmente en pacientes con enfermedad invasiva o problemas inmunológicos, hay que actuar con precaución debido al posible fracaso del tratamiento (García de Lomas J *et al*, 2007; García-Cobos S *et al*, 2007; Sevillano D *et al*, 2009).

Frente al nuevo marco que dibuja el aumento en la prevalencia de los fenotipos de resistencia BLNAR y BLPACR se hace necesaria una reevaluación de los tratamientos administrados comúnmente frente a las infecciones causadas por *H. influenzae* así como la investigación de la actividad de nuevas formulaciones o

antibióticos frente a estos fenotipos, ya que la necesidad de implantar nuevas formulaciones o antibióticos reside en la prevalencia de los fenotipos de resistencia existentes y no tanto en la actividad frente a los fenotipos sensibles. Debido a que los ensayos clínicos no incluyen suficiente número de pacientes infectados por cepas BLNAR o BLPACR, una aproximación farmacodinámica experimental que permita simular las concentraciones fisiológicas alcanzadas en humanos se convierte en una herramienta indispensable para evaluar la actividad antibiótica en la terapia frente a los fenotipos de resistencia de *H. influenzae*.

Por tanto, la evaluación de los antibióticos β -lactámicos, ya sean los empleados tradicionalmente o los de reciente comercialización, debe basarse en el estudio de la actividad farmacodinámica, siendo los parámetros FC/FD los más adecuados para predecir la eficacia de un antimicrobiano. El $T_{>CMI}$ ha sido considerado el índice FC/FD que predice la eficacia en estos antibióticos. Tradicionalmente, valores $\geq 40\%$ del intervalo de dosis para penicilinas y $\geq 50\%$ para cefalosporinas se han relacionado con la erradicación bacteriana y la consecuente eficacia terapéutica en modelos animales e infecciones humanas (Ball P *et al*, 2002; Craig WA, 1998; Dagan R *et al*, 2001; Nielsen EI *et al*, 2011).

A pesar de la premisa generalmente aceptada de que la fracción no unida a proteínas es la fracción activa *in vitro*, y probablemente *in vivo*, (Craig WA & Kunin CM, 1976), se ha visto que debido a la alta reversibilidad de la unión a proteínas la actividad del fármaco puede ser más elevada que la observada cuando se ensaya la fracción libre, también para antibióticos con elevada unión a proteínas (Moellering RC *et al*, 2006). Sin embargo, los parámetros FC/FD que predicen la eficacia de un

fármaco (C_{\max}/CMI , ABC/CMI , $T_{>CMI}$), así como los puntos de corte que determinan la sensibilidad de un antibiótico, están basados en las concentraciones libres extrapoladas desde las concentraciones totales de antibiótico en función de la unión a proteínas. Debido a que se ha demostrado, que la extrapolación de la concentración de fármaco activo a partir de la concentración total en base a tasa de unión a proteínas es inadecuada para investigar la actividad antibacteriana (Sevillano D *et al*, 2007) en el primer estudio en el que se analizó la adecuación de los puntos de corte se emplearon las concentraciones totales y en el segundo se emplearon las concentraciones totales y libres para conocer la importancia del papel de la unión a proteínas.

En base a estas premisas, empleando un modelo farmacocinético *in vitro* se estudió la actividad de una nueva cefalosporina oral de tercera generación, cefditoren, en comparación con dos de los β -lactámicos empleados habitualmente en las infecciones respiratorias en la comunidad, así como la actividad de una formulación mejorada de amoxicilina/ácido clavulánico (2000/125 mg) frente a los diferentes fenotipos de resistencia de *H. influenzae*. Cefditoren es una cefalosporina oral de tercera generación con una actividad intrínseca similar a cefotaxima frente a *S. pneumoniae* (Fenoll A *et al*, 2007) resistente a penicilina y *H. influenzae* (García-de-Lomas J *et al*, 2006) resistente a ampicilina, que ha demostrado eficacia clínica y bacteriológica en el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio inferior (Granizo JJ *et al*, 2007; Álvarez-Sala JL *et al*, 2006); mientras que amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000/125 mg administrada cada 12h es una nueva formulación que optimiza los parámetros farmacodinámicos y proporciona un $T_{>CMI}$ de al menos el 50% para cepas con una CMI a amoxicilina $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ (Kaye CM *et al*, 2001).

En última instancia, se valoró la eficacia de los tratamientos convencionales frente a la faringitis producida por GABHS, amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico, así como la eficacia de cefditoren como alternativa frente a una población compuesta por diferentes especies comunes en el tracto respiratorio que simulaban un nicho nasofaríngeo; lo que a su vez permitió evaluar la eficacia de diferentes tratamientos en relación con el concepto de patógeno indirecto.

1. ESTUDIO 1: Adecuación de los puntos de corte que definen los fenotipos de resistencia BLNAR y BLPACR mediante el estudio de la actividad bactericida de diferentes β -lactámicos.

En este estudio se analizó mediante un sistema farmacodinámico *in vitro* la actividad de las concentraciones totales obtenidas en suero a lo largo de 24 h tras la administración oral de cefditoren 400 mg administrado cada 12 h, cefuroxima 500 mg administrado cada 12 h y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg administrado cada 8 o cada 12 h. Estas pautas antibióticas fueron enfrentadas a cuatro cepas de *H. influenzae*: una cepa BLNAS con CMI a ampicilina = 0,03 μ g/ml, una cepa BLNAR con CMI a ampicilina = 16 μ g/ml y dos cepas β -lactamasa positivas (cepas BLPAR y BLPACR con CMI a ampicilina = 4 μ g/ml y a amoxicilina/clavulánico de 0,5 y 4 μ g/ml, respectivamente). Todas las cepas fueron sensibles a amoxicilina/ácido clavulánico y cefuroxima de acuerdo a los puntos de corte propuestos por el CLSI (S \leq 4/2 μ g/ml para amoxicilina/ácido clavulánico, S \leq 4 μ g/ml para cefuroxima) (CLSI, 2014) pero las cepas BLNAR y BLPACR fueron resistentes a ambos antibióticos si se consideraban los puntos de corte propuestos por la BSAC (R $>$ 2 μ g/ml para

amoxicilina/ácido clavulánico y cefuroxima) (BSAC, 2013). No están definidos los puntos de corte en el CLSI o la BSAC para cefditoren, pero conforme a los puntos de corte sugeridos para determinar la sensibilidad de $\leq 0,25 - \leq 1 \mu\text{g/ml}$ (Johnson DM *et al*, 2000; Jones RN *et al*, 1998; Peric M *et al*, 2003), todas las cepas fueron consideradas sensibles, ya que mostraron un valor de CMI $\leq 0,12 \mu\text{g/ml}$.

Tras llevar a cabo las simulaciones farmacodinámicas se observó que para las cepas BLNAS y BLPAR, ambas sensibles a amoxicilina/ácido clavulánico, cefditoren y cefuroxima, no existieron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos, observándose reducciones de $\geq 6 \log_{10}$ a las 12 h que se mantuvieron o incrementaron en el tiempo 24 h. Era de esperar el éxito de estas pautas antibióticas si se tiene en cuenta que estas cepas fueron sensibles a los antibióticos testados y que el índice predictor de eficacia para los antibióticos β -lactámicos, el $T_{>\text{CMI}}$, fue $\geq 49\%$.

Para las cepas BLNAR y BLPACR, se observó actividad bactericida para cefditoren y cefuroxima a partir de la hora 4 en adelante, pero a pesar de la sensibilidad de estas cepas a amoxicilina/ácido clavulánico de acuerdo a los puntos de corte propuestos por el CLSI (CLSI, 2014), no se alcanzó actividad bactericida a lo largo del periodo de experimentación para ninguna de las pautas de amoxicilina/ácido clavulánico. En base a estos datos, se encontraron diferencias significativas entre la actividad de cefditoren y cefuroxima frente a las dos pautas de amoxicilina/ácido clavulánico a partir de la hora 8, observándose una reducción del inóculo inicial a las 24 h de $\geq 6 \log_{10}$ para cefditoren y cefuroxima y de $0,4-0,8 \log_{10}$ para ambas pautas de amoxicilina/ácido clavulánico. Puesto que para ambas pautas de amoxicilina/ácido clavulánico el $T_{>\text{CMI}}$ fue $\leq 33\%$, desde un aspecto farmacodinámico no se esperaba una

reducción del inóculo inicial significativa. Del mismo modo, también se observó que las reducciones en \log_{10} fueron significativamente mayores para cefditoren frente a cefuroxima en el tiempo 12 h, el cual produjo una caída más rápida del inóculo inicial a lo largo del primer periodo de dosificación. El $T_{>CMI}$ para cefditoren fue $\geq 99\%$ para ambas cepas, BLNAR y BLPACR, pero en el caso de cefuroxima este índice fue de tan solo el 18% ($CMI = 4 \mu\text{g/ml}$), un valor muy inferior al determinado para predecir el éxito en cefalosporinas ($T_{>CMI} \geq 50\%$).

La evaluación de la actividad antimicrobiana debe incluir el estudio del perfil farmacodinámico de los β -lactámicos orales a las pautas comúnmente administradas para ver la adecuación de los puntos de corte que definen la sensibilidad y validar su uso en la práctica diaria. Los puntos de corte de *Haemophilus influenzae* establecidos para algunos β -lactámicos necesitan ser redefinidos debido a la variabilidad existente en los valores propuestos por los principales comités, CLSI y BSAC (Tabla 5). Teniendo en cuenta que los puntos de corte propuestos por el CLSI para amoxicilina/ácido clavulánico consideran a las cepas BLNAR y BLPACR sensibles a este antibiótico y los puntos de corte propuestos por la BSAC las consideran resistentes, y en base a los resultados obtenidos tras llevar a cabo los tratamientos con amoxicilina/ácido clavulánico en los que no se alcanzó actividad bactericida con ninguna de las dos pautas, los puntos de corte propuestos por la BSAC parecen más adecuados desde un punto de vista farmacodinámico al considerar estas cepas resistentes. Se obtuvieron resultados similares en estudios previos con cepas resistentes (CMI amoxicilina/ácido clavulánico = $5 \mu\text{g/ml}$) tras 12 h de exposición a amoxicilina/clavulánico 875/125 mg administrada cada 12 h (MacGowan AP *et al*, 2004). Del mismo modo, en un estudio en el que se evaluó la relación entre el valor de

CMI y el fenotipo BLPACR (portador de mutaciones en el gen *ftsI*, productor de β -lactamasas y por definición resistente a amoxicilina/ácido clavulánico), se observó que cuando se utilizaron los puntos de corte para amoxicilina/ácido clavulánico propuestos por la BSAC, se consideraron resistentes el 80,2% de las cepas BLNAR y el 93,2% de las cepas BLPACR analizadas; en contraste con el 9,9% y 25% de resistencia, respectivamente, obtenido al aplicar los puntos de corte propuestos por el CLSI (sensible $\leq 4/2$ $\mu\text{g/ml}$, resistente $\geq 8/4$). Sin embargo, cuando se aplicaron los puntos de corte propuestos por la BSAC, el 57% de las cepas β -lactamasa positivas se consideraron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico (Sevillano D *et al*, 2009). De esta forma, el incremento en la sensibilidad para detectar las mutaciones de dicho gen se ve acompañado en una reducción en la especificidad, ya que se considerarían portadoras de la mutación en el gen *ftsI* cepas que únicamente son productoras de β -lactamasas.

La concentración de ampicilina que define el fenotipo BLNAR resulta crucial debido a que las mutaciones en el gen *ftsI* que codifica la PBP3 se han encontrado en cepas que presentan una CMI por debajo de 1 $\mu\text{g/ml}$ (García-de-Lomas J *et al*, 2006; Hotomi M *et al*, 2007; García-Cobos S, 2008) considerándose sensibles según los criterios del CLSI (CLSI, 2014) y la BSAC (BSAC, 2013). Estas mutaciones también se han encontrado en el fenotipo BLPACR junto con la β -lactamasa TEM-1 (Matic V *et al*, 2003).

La optimización farmacodinámica de las pautas antibióticas frente a los fenotipos BLNAR y BLPACR debe ser reexaminada debido al descenso de la actividad de las formulaciones clásicas anti-*Haemophilus* como las pautas de

amoxicilina (≤ 875 mg administrada dos o tres veces al día) con o sin ácido clavulánico (125 mg dos o tres veces al día). Sin embargo, estos fenotipos resistentes a ampicilina muestran unos valores de $MIC_{50}/MIC_{90} \leq 0,015/0,03$ para cefalosporinas de tercera generación como cefditoren o cefotaxima (García-de-Lomas J *et al*, 2006; Biedenbach DJ & Jones RN, 2009).

Con respecto a cefuroxima el recuento para todas las cepas fue inferior al límite de detección a las 24 h, lo que resultó sorprendente si se tiene en cuenta que el parámetro predictor de eficacia, $T_{>CMI}$ fue de tan solo el 18%. En base a los puntos de corte propuestos por la BSAC estas cepas serían consideradas resistentes y en base al CLSI, sensibles; pero éste comité recomienda no tratar con dicho antibiótico a pesar de su sensibilidad *in vitro*.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que cefditoren y cefuroxima presentan la mayor actividad bactericida mantenida en el tiempo frente a *H. influenzae* resistente a ampicilina a pesar de la producción de β -lactamasas y las mutaciones en el gen *ftsI*. Desde una perspectiva farmacodinámica, los puntos de corte propuestos por la BSAC para ampicilina parecen ser más adecuados para definir o detectar las cepas BLNAR y BLPACR. Detectar estas cepas puede ser importante en la práctica clínica debido al aumento de la prevalencia de este fenotipo y la baja respuesta a los antibióticos comúnmente usados. Estudios continuos de vigilancia que determinen si la incidencia de estos fenotipos se está incrementando y monitoricen la presencia de la mutación del gen *ftsI* en cepas con diferentes valores de CMI, así como las pruebas relativas de la actividad farmacodinámica de las diferentes pautas de antibióticos frente

a la aparición o el aumento de las cepas mostradas en la literatura, deberían darnos un marco completo del problema y de las estrategias para solucionarlo.

2. ESTUDIO 2: Evaluación del papel de la unión a proteínas en la actividad de nuevas alternativas frente a los fenotipos de resistencia de *H. influenzae*.

Como ya se ha comentado, el $T_{>CMI}$ ha sido considerado el índice FC/FD que predice la eficacia en antibióticos β -lactámicos, relacionando valores $\geq 40\%$ del intervalo de dosis para penicilinas y $\geq 50\%$ para cefalosporinas con la eficacia terapéutica (Ball P *et al*, 2002; Craig WA, 1998; Dagan R *et al*, 2001; Nielsen EI *et al*, 2011). La presencia de mutaciones en el gen *ftsI* en el fenotipo BLNAR y la producción adicional de β -lactamasas en el fenotipo BLPACR pueden influenciar los valores de los índices FC/FD que predicen la actividad bactericida, mediante el incremento de la CMI y la reducción de la concentración de antibiótico debido a la degradación enzimática.

Puesto que existe cierta controversia acerca de la unión a proteínas tanto *in vivo* (Moellering EP & Eliopoulos GM, 2006) como *in vitro* (Cafini F *et al*, 2007; Sevillano D *et al*, 2007), en este caso, los experimentos fueron llevados a cabo tanto con la fracción libre como con la total de ambos antibióticos, lo que permitió explorar tanto la potencial actividad máxima como la mínima (por ejemplo, el rango que contiene la actual actividad) y el papel de la unión a proteínas.

De este modo, se exploró la actividad bactericida a lo largo del intervalo de dosis de las concentraciones totales y libres simuladas en suero obtenidas tras la

administración oral de amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000/125 mg y cefditoren 400 mg administrados cada 12 h frente a una cepa BLNAS, una cepa BLNAR y una cepa BLPACR durante un periodo de 48 h. Amoxicilina/ácido clavulánico LP 2000/125 mg es una formulación reciente que proporciona la liberación inmediata del ácido clavulánico, así como la liberación inmediata (875 mg) y prolongada (1125 mg) de la amoxicilina. Esto permite mantener concentraciones elevadas de amoxicilina en suero con un $T_{>CMI}$ más elevado que el obtenido con las formulaciones convencionales, lo que se traduce en una mejora de la respuesta al tratamiento.

Frente a la cepa BLNAS (sensible a cefditoren y a amoxicilina/ácido clavulánico) ambos antibióticos mostraron una reducción $>3 \log_{10}$, pero cefditoren (tanto la concentración total como la libre) mostró una actividad bactericida significativamente mayor a partir de la administración de la segunda dosis frente a ambas concentraciones de amoxicilina/ácido clavulánico, con un $T_{>CMI}$ observado $>60\%$ para ambos antibióticos.

La actividad bactericida mostrada por cefditoren se mantuvo frente a las 2 cepas portadoras de la mutación N526K en el gen *ftsI* (sensibles a cefditoren y resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico), con un $T_{>CMI}$ para cefditoren libre $>44\%$. Cuando se llevaron a cabo las simulaciones frente a estas cepas, tanto con las concentraciones totales como libres, se observó que dicho fármaco mostraba actividad bactericida desde la hora 6-8 con reducciones del inóculo inicial que llegaron a alcanzar $5,5 \log_{10}$ y $3,7 \log_{10}$ para la cepa BLNAR y $>6,3 \log_{10}$ y $4,6 \log_{10}$ tras 48 h de simulación para la cepa BLPACR, respectivamente.

En el caso de amoxicilina/ácido clavulánico frente a la cepa BLNAR, tanto la concentración libre como la total dieron lugar a una actividad bactericida elevada que se mostró a partir de la hora 6 a pesar de su elevada CMI (8 µg/ml), un valor con el que se considera a la cepa resistente. Aunque la formulación 16:1 consigue aumentar los tiempos supra-CMI con respecto a la formulación convencional, el $T_{>CMI}$ para amoxicilina/ácido clavulánico total y libre fue de 34,6% y 28,3% del intervalo de dosis, respectivamente; valores inferiores a los necesarios clásicamente para llegar a la actividad bactericida en penicilinas ($T_{>CMI} = 40\%$).

En cambio, para la cepa BLPACR, la producción de la β -lactamasa TEM-1 supone un mecanismo adicional de resistencia que hace que amoxicilina/ácido clavulánico no muestre actividad bactericida a pesar de que la CMI sea igual que la de la cepa BLNAR. Esta ausencia de actividad fue debida a que las concentraciones de ácido clavulánico fueron $<0,5$ µg/ml a partir de la hora 4, con concentraciones indetectables en la hora 8. A su vez, desde la hora 4 en adelante, se incrementó la actividad β -lactamasa, alcanzando cifras similares a las obtenidas en las simulaciones sin antibiótico desde la hora 8 a la 12. Este aumento enzimático desencadenó la inactivación de la amoxicilina, disminuyendo su concentración y dando lugar al fracaso del tratamiento.

Para las simulaciones con las cepas β -lactamasa negativas la proporciones experimentales de las concentraciones libres/totales de amoxicilina son similares a lo largo del tiempo (0,8-0,9) (Tabla 11). Sin embargo, estas tasas son variables en las simulaciones llevadas a cabo con la cepa BLPACR (desde 0,9 en la hora 1 hasta 0,01 en la hora 6), debido a la influencia de la inactivación de la amoxicilina llevada a cabo

por las β -lactamasas. Aunque el valor es el mismo hasta la hora 1, las diferencias que se presentan a lo largo del tiempo, dan lugar a una amplia diferencia en la hora 6 (0,8 vs. 0,01). Esto es debido a que la acción de las β -lactamasas, lógicamente, afecta más a baja (concentración libre) que a alta concentración (concentración total). Debido a esto, para la cepa BLPACR el $T_{>CMI}$ experimental para amoxicilina disminuye de un 34,6% a un 23,3% cuando se simulan concentraciones totales y de 28,3% a 10,4% cuando se simulan las libres.

Desde que se conocen cepas BLNAR y BLPACR con la misma CMI, el cálculo del $T_{>CMI}$ a partir de los resultados obtenidos en los ensayos en fase I proporcionan una información que no es válida, ya que no se tiene en cuenta la influencia de la actividad β -lactamasa sobre este parámetro. Esto sugiere que administrar dos veces al día ácido clavulánico puede resultar inadecuado frente a cepas de *H. influenzae* que muestran una elevada CMI a amoxicilina/ácido clavulánico. En un estudio previo que utiliza una metodología similar (Löwdin E *et al*, 2002), se observó que la breve exposición al ácido clavulánico (45% en 24 h) al administrar la formulación de liberación prolongada 2000/125 mg parece no afectar a la actividad bactericida de las concentraciones de amoxicilina frente a las cepas β -lactamasa positivas, posiblemente debido al efecto inhibidor post- β -lactamasa. Probablemente, las diferencias observadas entre ambos estudios son debidas a los bajos valores de CMI para amoxicilina/ácido clavulánico de las cepas empleadas en el otro estudio (0,5 a 0,75 μ g/ml); por lo que probablemente estas cepas no presentaban la mutación en el gen *ftsI* y no eran BLPACR.

Por otra parte, se puede argumentar que, *in vivo*, el descenso en las concentraciones de amoxicilina puede ser menos pronunciado que en los sistemas *in vitro*, aunque experimentos previos realizados *in vivo* han mostrado niveles más bajos de ampicilina cuando la infección es causada por un microorganismo β -lactamasa positivo frente a un β -lactamasa negativo (Lavoie GY & Bergeron MG, 1985).

Los resultados de este estudio experimental señalan que, desde un punto de vista farmacodinámico, el $T_{>CMI}$ teórico (calculado usando los datos farmacocinéticos obtenidos en los estudios en fase I) frente a las cepas β -lactamasa positivas con elevada CMI a ampicilina o amoxicilina/ácido clavulánico, debe ser utilizado con precaución ya que la presencia de β -lactamasas puede inactivar el antibiótico haciendo imprecisos los cálculos teóricos. Aún así, se ha observado que el valor que predice la eficacia para β -lactámicos no es aplicable en todos los casos, ya que tanto en este estudio al enfrentar la cepa BLNAR a cefditoren libre o amoxicilina/ácido clavulánico como en el Estudio 1 al enfrentar las cepas BLNAR y BLPACR a cefuroxima se ha observado actividad bactericida a pesar de mostrar un $T_{>CMI}$ inferior al predictor de eficacia para penicilinas (40%) y cefalosporinas (50%).

Por otro lado, se ha observado que la actividad bactericida experimental de cefditoren se mantiene a lo largo del intervalo de dosis a pesar de las mutaciones en el gen *ftsI* y/o la producción de β -lactamasas. Aunque cefditoren presenta una elevada unión a proteínas, la concentración libre fue suficiente para mostrarse activa frente a las cepas de *H. influenzae* que, en el presente estudio, muestran unos valores de CMI bajos a pesar del fenotipo de resistencia (Fenoll A *et al*, 2007; García-de-Lomas J *et al*, 2007). Amoxicilina/ácido clavulánico mostró actividad bactericida frente a la cepa

sensible a ampicilina y la cepa BLNAR tanto con la concentración total como libre, pero no consiguió reducir el inóculo inicial $\geq 3\log_{10}$ frente a la cepa BLPACR. Para los antimicrobianos estudiados, cuando se alcanza actividad bactericida frente a una determinada cepa, esta actividad se consigue tanto con la concentración total como con la libre.

3. ESTUDIO 3: Actividad de diferentes β -lactámicos sobre una población polimicrobiana formada por aislados comunes del tracto respiratorio.

La ecología y la resistencia en la microbiota humana son fenómenos que se han relacionado desde que existen evidencias de que el fitness bacteriano disminuye, al menos a corto plazo, debido a la resistencia; por lo que las barreras naturales en el fitness genético pueden limitar la dispersión de las cepas portadoras de resistencias (Gillespie SH *et al*, 2002). En los modelos compartimentales, el fitness de una cepa bacteriana es directamente proporcional a su habilidad para competir con otras cepas e inversamente proporcional a su aclaramiento (Rozen DE *et al*, 2007). Si existe heterogeneidad en el fitness, aquellas cepas con mayor fitness serán las que prevalezcan (Rozen DE *et al*, 2007). La dinámica de diferentes subpoblaciones en un ambiente libre de antibiótico son la línea base que puede ser alterada con los tratamientos antibióticos, ya que interfieren en el fitness bacteriano (incluyendo colonización y transmisión), mientras que su resistencia puede asociarse con un descenso del fitness cuando no se encuentra presente el antibiótico frente al que muestran resistencia (Nuermberger EL & Bishai WR, 2004).

En este estudio se ha intentado simular un nicho nasofaríngeo en el que se ha mezclado un inóculo mixto de aislados comunes del tracto respiratorio mostrando los fenotipos de resistencia clásicos (producción de β -lactamasas en *H. influenzae* y resistencia a penicilina en *S. pneumoniae*) y emergentes (mutación concomitante del gen *ftsI* a la producción de β -lactamasas en la cepa BLPACR). A pesar de que hasta el 80% de la población sana es portadora de *H. influenzae* (Murphy TF, 2006), con un 50% de muestras positivas con múltiples cepas (Smith-Vaughan HC *et al*, 1996) y aunque se ha producido un incremento de la tasa de aislamiento de cepas BLPACR (Dabernat H & Delmas C, 2012; Park C *et al*, 2013), el uso de cepas con diferentes fenotipos de resistencia puede suponer una limitación en este estudio. Sin embargo, la resistencia fue necesaria como marcador para mostrar las diferencias entre los 3 antibióticos usados frente a cepas con diferente comportamiento (sensibilidad, protección mediante un inhibidor o resistencia) en presencia de β -lactamasas.

Otra limitación del estudio pudo ser la exposición del inóculo mixto a los antibióticos con idénticas proporciones de las diferentes cepas a tiempo 0. En una situación patológica, el inóculo de *S. pyogenes* debe ser mayor que el de los otros microorganismos; como se observa en este estudio al finalizar las simulaciones libres de antibiótico donde *S. pyogenes* fue la población dominante a las 24 h (96,3%) junto con una pequeña población de la cepa de BLPAR (3,17%).

Las bacterias productoras de β -lactamasas se encuentran frecuentemente en pacientes con amigdalitis recurrente, donde la exposición a antibióticos, en general, y a β -lactámicos en particular, selecciona la flora nasofaríngea (Brook I, 2001). Se ha visto que pacientes con amigdalitis estreptocócicas cuyo tratamiento con penicilina

falló presentaban cepas con mayor actividad β -lactamasa que aquellos que se curaron con el mismo tratamiento (Casey JR & Pichichero ME, 2007). Esto ha conducido al concepto de copatogenicidad o patógeno indirecto, definido como una situación en la cual una bacteria sensible a un tipo de fármaco es protegida por otra/s cepa/s bacteriana/s localizadas en el mismo lugar y que carecen de esa sensibilidad, como por ejemplo la protección de *S. pyogenes* sensible a penicilina debido a la producción de β -lactamasas por bacterias resistentes a penicilina (Brook I, 2009; Casey JR & Pichichero ME, 2007). Estos autores sostienen la hipótesis de que la copatogenicidad es responsable de los fallos terapéuticos en los tratamientos con penicilina frente a la faringitis provocada por los GABHS, debido a la producción de β -lactamasas por microorganismos presentes en la faringe como *H. influenzae* o *M. catarrhalis*. En cambio, otros autores se muestran contrarios a esta idea argumentando que aunque existiera una diferencia clínica entre penicilina y cefalosporinas, ésta solo se da cuando se trata a pacientes que son portadores de estreptococos. Y por otra parte, debido a que además del objetivo clínico de la terapia antimicrobiana que es erradicar al patógeno infeccioso, también hay que procurar minimizar la aparición de resistencias en la flora normal y la prevención de la transmisión de clones resistentes desde la nasofaringe, los costes ecológicos, además de económicos, del uso de cefalosporinas supondrían una desventaja superior a la eficacia en el tratamiento (Bisno AL, 2004; Shulman ST & Gerber MA, 2004).

Con el fin de evaluar el impacto del fenómeno del patógeno indirecto *in vitro*, en este experimento se estudió el efecto de los perfiles en suero a lo largo de 24 h de cefditoren 400 mg administrado cada 12 h, amoxicilina 875 mg administrada cada 8 h y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg administrada cada 8 h sobre la evolución

natural del nicho simulado. Aunque se puede argumentar que las concentraciones en suero no se parecen a las que existen en la nasofaringe, las concentraciones libres se usaron como una aproximación a pesar de que el elevado porcentaje de unión a proteínas de las cefalosporinas puede no tener una elevada influencia en la muerte bacteriana (Sevillano D *et al*, 2008).

Para conocer el efecto de la producción de β -lactamasas sobre la farmacocinética antibiótica y sus consecuencias sobre los parámetros farmacodinámicos que predicen la actividad antibacteriana, estos parámetros fueron determinados con las concentraciones medidas en las simulaciones con inóculo mixto y aquellas libres de bacteria. Así, en este estudio, la presencia de β -lactamasas no altera la concentración de cefditoren (resistente a la β -lactamasa TEM-1) pero modifica la concentración de amoxicilina a lo largo de todo el intervalo de dosis en las simulaciones con amoxicilina 875 mg administrada cada 8 h, y en un rango menor (a partir de las 4 h) en las simulaciones con amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg administrada cada 8 h.

Como resultado, la actividad de cefditoren no se vio influenciada por la presencia de β -lactamasas, erradicando la cepa de *S. pyogenes* y copatógenos como *H. influenzae*, y disminuyendo la población de *S. pneumoniae* en un 94%. Para las simulaciones con amoxicilina/ácido clavulánico, la producción de β -lactamasas por la cepa BLPACR (resistente a amoxicilina/ácido clavulánico con un $T_{>CMI}$ de tan sólo 4,6%) protege a la cepa BLPAR de *H. influenzae*, que aunque es sensible a amoxicilina/ácido clavulánico ($CMI = 2 \mu g/ml$; $T_{>CMI} = 32,8\%$), no fue erradicada, disminuyendo mínimamente con respecto al inóculo inicial. Lo mismo ocurrió con la

cepa de *S. pneumoniae* (CMI = 2 µg/ml; $T_{>CMI} = 32,8\%$) que fue reducida $<1 \log_{10}$. Sin embargo, la presencia de β -lactamasas no impidió la erradicación de *S. pyogenes* (CMI = 0,03 mg/ml; $T_{>CMI} = 99,9\%$).

Por el contrario, en las simulaciones con amoxicilina 875 mg, el mantenimiento o incluso el incremento en la población de las cepas productoras de β -lactamasas ($T_{>CMI} = 0\%$) protegió no sólo la cepa de *S. pneumoniae* (descenso en $T_{>CMI}$ del 43,2% al 17,7% en las simulaciones sin bacteria frente a las realizadas con inóculo mixto) sino también la cepa de *S. pyogenes* (descenso en $T_{>CMI}$ del 99,9% al 24,9%) frente a la erradicación.

A principios de los años 70 la tasa de fallo terapéutico en infecciones del tracto respiratorio para penicilinas oscilaba en torno al 2-10%. A finales de esta década, la tasa de fallo bacteriológico comenzó a aumentar hasta llegar a representar el 30% (Pichichero ME *et al*, 2000), probablemente debido al aumento de la producción de β -lactamasas. A pesar de las diferentes causas que dan lugar a un fallo en el tratamiento (falta de conformidad, reexposición, erradicación de la flora faríngea habitual, fitness bacteriano) y de los informes contradictorios acerca de la copatogenicidad (Pichichero ME *et al*, 2000; Stjernquist-Desatnik A & Holst E, 1999) los resultados de este estudio refuerzan el concepto de “patógeno indirecto” ya que la producción de β -lactamasas en los inóculos mixtos (similares a los presentes en la flora faríngea) cuando el ácido clavulánico no está presente, reduce las concentraciones de amoxicilina y el valor de los parámetros farmacocinéticos frente a *S. pneumoniae* o *S. pyogenes*, lo que puede impedir que se obtenga la erradicación.

La presencia de ácido clavulánico en las simulaciones con amoxicilina/ácido clavulánico administrado cada 8 h contrarresta este efecto indirecto de patogenicidad, protegiendo la amoxicilina de la degradación llevada a cabo por las β -lactamasas, por lo que *S. pyogenes*, cepa altamente sensible, fue erradicada. La producción de β -lactamasas fue realizada por una cepa resistente a amoxicilina/ácido clavulánico (cepa BLPACR), que presentó un aumento de su población a las 24 h de 0,5 log₁₀ cuando se trató con dicho antibiótico. Sin embargo, el ácido clavulánico no fue capaz de proteger eficazmente a la amoxicilina de la degradación enzimática frente a cepas con CMI en el límite de la sensibilidad, como la cepa de *H. influenzae* BLPAR y *S. pneumoniae* (CMI = 2 mg/ml). Estas cepas fueron protegidas de la erradicación, con una población similar al inóculo inicial en el tiempo 24. La capacidad de resistencia de cefditoren frente a las β -lactamasas TEM-1 impide este efecto de copatogenicidad sobre la producción de estas enzimas por parte de las cepas de *H. influenzae*.

Aunque este estudio es sólo una aproximación acerca de lo que puede ocurrir en la nasofaringe humana, los resultados sugieren que, al menos *in vitro*, la presencia de microorganismos productores de β -lactamasas puede proteger a otros microorganismos no productores presentes en este nicho. Este efecto de “patógeno indirecto” o copatogenicidad parece ser gradual ya que los inhibidores de β -lactamasas (como el ácido clavulánico en los regímenes administrados 3 veces al día) contrarrestan este efecto frente a cepas muy sensibles a amoxicilina como *S. pyogenes*, pero no frente a cepas que presentan valores de CMI en el límite de sensibilidad como *S. pneumoniae*. Estos hallazgos observados *in vitro* indican una potencial ventaja terapéutica para las cefalosporinas resistentes a β -lactamasas con una actividad intrínseca elevada frente a los estreptococos.

Conclusiones

1. Las formulaciones convencionales, amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg administradas cada 8 o cada 12 horas, son tratamientos ineficaces frente a los nuevos fenotipos de resistencia de *H. influenzae*, BLNAR y BLPACR.
2. La formulación mejorada de amoxicilina/ácido clavulánico (2000/125 mg) tampoco garantiza el éxito para el tratamiento empírico, ya que este antibiótico mostró actividad bactericida frente a la cepa BLNAR pero no frente a la cepa BLPACR.
3. El CLSI no recomienda cefuroxima para el tratamiento de las cepas BLNAR, pero nuestros resultados demuestran que cefuroxima 500 mg puede ser considerada una alternativa en el tratamiento frente a los fenotipos de resistencia de *H. influenzae*, a pesar de que el $T_{>CMI}$ (18%) fue muy inferior al determinado como predictor de eficacia.
4. Entre los antimicrobianos estudiados, cefditoren 400 mg ha sido el antibacteriano más eficaz a pesar de la producción de β -lactamasas y/o de las mutaciones en el gen *ftsI*, mostrándose como una excelente alternativa a los tratamientos convencionales recomendados frente a este patógeno, así como en el tratamiento de la faringoamigdalitis estreptocócica.
5. Según nuestros resultados, desde un punto de vista farmacodinámico, los puntos de corte a ampicilina propuestos por la BSAC son más adecuados para definir o detectar las cepas BLNAR y BLPACR, lo que puede ser importante

en la práctica clínica debido al aumento de la prevalencia de este fenotipo y la baja respuesta a los antibióticos comúnmente usados.

6. Desde un punto de vista farmacodinámico, el $T_{>CMI}$ teórico (calculado a partir de los datos farmacocinéticos obtenidos en los estudios en fase I) frente a las cepas β -lactamasa positivas con elevada CMI a ampicilina o amoxicilina/ácido clavulánico no es predictor de efectividad, ya que la presencia de β -lactamasas puede inactivar el antibiótico haciendo imprecisos los cálculos teóricos.
7. El valor que predice la eficacia para penicilinas ($T_{>CMI} > 40\%$) y cefalosporinas ($T_{>CMI} > 50\%$) no es aplicable en todos los casos, ya que se observó actividad bactericida con cefuroxima, cefditoren y amoxicilina/ácido clavulánico LP a pesar de mostrar un $T_{>CMI} < 45\%$ para las cefalosporinas y $< 35\%$ para la penicilina.
8. Para cefditoren y amoxicilina/ácido clavulánico LP, cuando se alcanza actividad bactericida frente a una determinada cepa, esta actividad se consigue tanto con la concentración total como con la libre.
9. *In vitro*, la presencia de microorganismos productores de β -lactamasas protege a otros microorganismos no productores presentes en este nicho, indicando una potencial ventaja terapéutica para cefalosporinas como cefditoren, resistente a β -lactamasas y con actividad intrínseca elevada frente a los estreptococos.

10. Según nuestros resultados, el efecto de patógeno indirecto parece ser gradual ya que el ácido clavulánico en pautas de 3 veces al día contrarresta este efecto frente a cepas muy sensibles a amoxicilina como *S. pyogenes*, pero no frente a cepas que presentan valores de CMI en el límite de sensibilidad como *S. pneumoniae*.
11. Los sistemas farmacodinámicos *in vitro* suponen una herramienta útil y precisa para el estudio de la actividad antimicrobiana de los tratamientos convencionales y las nuevas alternativas frente a fenotipos cuya escasa prevalencia en el medio dificultan el desarrollo de ensayos clínicos.

Bibliografía

- Acuin J.** 2004. Chronic suppurative otitis media - Burden of illness and management options. *World Health Organization*. http://www.who.int/pbd/publications/Chronicsuppurativeotitis_media.pdf
- Alou L, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Echeverría O, Gómez-Lus ML, Prieto J.** 2005. Is there a pharmacodynamic need for the use of continuous *versus* intermittent infusion with ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*? An *in vitro* pharmacodynamic model. *J Antimicrob Chemother* **55**:209–213.
- Álvarez F, Bouza E, García-Rodríguez JA, Mensa J, Monsó E, Picazo JJ, Sobradillo V, Torres A, Moya M, Martínez M, Pérez F, Puentes T, Cañadas JL.** 2002. Segundo documento de consenso sobre el uso de antimicrobianos en la exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista Española de Quimioterapia* **15**(4):375-385.
- Álvarez-Sala JL, Kardos P, Martínez-Beltrán J, Coronel P, Aguilar L.** 2006. Clinical and bacteriological efficacy in treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis with cefditoren-pivoxil versus cefuroxime-axetil. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1762–1767.
- Andrews JM.** 1999. Microbiological assays. En: Reeves BS, Wise R, Andrews JM, White LO (eds). *Clinical antimicrobial assays*. Oxford University Press, New York. 35–44.
- Augmentin package insert.** www.fda.gov.

- Azanza JR, García Quetglas E, Muñoz MJ.** 2006. Farmacocinética, relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas y efectos adversos de los antimicrobianos. En: García Rodríguez JA, García Sánchez JE, Gobernado M, Picazo JJ, Prieto J, Antimicrobianos en medicina, 2ª Edición. Prous Science. 99-108.
- Ball P, Baquero F, Cars O, File T, Garau J, Klugman K, Low DE, Rubinstein E, Wise R, Consensus Group on Resistance and Prescribing in Respiratory Tract Infection.** 2002. Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. *J Antimicrob Chemother* **49**:31-40.
- Balter MS, La Forge J, Low DE, Mandell L, Grossman RF.** 2003. Canadian guidelines for the management of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Can Respir J* **10**(Suppl. B):3B-32B.
- Baquero F.** 2005. Evolution and the nature of time. *Int Microbiol* **8**:81-91.
- Barberán J, Mensa J.** 2009. Cefditoren en las infecciones de vías respiratorias bajas adquiridas en la comunidad. *Rev Esp Quimioter* **22**(3):144-150.
- Biedenbach DJ, Jones RN.** 2009. Update of cefditoren activity tested against community-acquired pathogens associated with infections of the respiratory tract and skin and skin structures, including recent pharmacodynamic considerations. *Diagn Microbiol Infect Dis* **64**(2):202-12.

- Bisno AL, Stevens D.** 2006. *Streptococcus pyogenes*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Enfermedades infecciosas, principios y práctica*, 6th ed. Elsevier España S.A. 2362-2379.
- Bisno AL.** 2004. Are cephalosporins superior to penicillin for treatment of acute streptococcal pharyngitis? *Clin Infect Dis* **38**(11):1535-7.
- Blaser J, Stone BB, Zinner SH.** 1985. Efficacy of intermittent *versus* continuous administration of netilmicin in a two-compartment in vitro model. *Antimicrob Agent Chemother* **27**: 343-349.
- Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, , Kaplan SL, Mace SE, McCracken GH Jr, Moore MR, St Peter SD, Stockwell JA, Swanson JT, Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America.** 2011. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **53**:e25–e76.
- British Society for Antimicrobial Chemotherapy.** 2013. BSAC Methods for antimicrobial susceptibility testing. Version 9.1
- Brook I, Gober AE.** 2005. Recovery of potential pathogens and interfering bacteria in the nasopharynx of otitis media-prone children and their smoking and nonsmoking parents. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **131**:509-512.

- Brook I, Gober AE.** 2006a. Recovery of interfering and beta-lactamase-producing bacteria from group A beta-haemolytic streptococci carriers and non-carriers. *J Med Microbiol* **55**:1741-1744.
- Brook I, Gober AE.** 2006b. Increased recovery of *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* in association with group A b-haemolytic streptococci in healthy children and those with pharyngo-tonsillitis. *J Med Microbiol* **55**: 989–992.
- Brook I.** 1994. Penicillin failure and copathogenicity in streptococcal pharyngotonsillitis. *J Fam Pract* **38**(2):175-179.
- Brook I.** 2001. The role of beta-lactamase producing bacteria and bacterial interference in streptococcal tonsillitis. *Int J Antimicrob Agents*. **17**:439-442.
- Brook I.** 2004. Beta-lactamase-producing bacteria in mixed infections. *Clin Microbiol Infect* **10**(9):777-784.
- Brook I.** 2007. Overcoming penicillin failures in the treatment of Group A streptococcal pharyngo-tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **71**: 1501–1508.
- Brook I.** 2009. The role of beta-lactamase-producing-bacteria in mixed infections. *BMC Infectious Diseases* **9**:202.
- Brook I.** 2013. Penicillin failure in the treatment of streptococcal pharyngo-tonsillitis. *Curr Infect Dis Rep* **15**(3):232-235.

Burkhardt O, Borner K, von der Höh N, Köppe P, Pletz MW, Nord CE, Lode H.

2002. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of linezolid and co-amoxiclav in healthy human volunteers. *J Antimicrob Chemother* **50**:707–712.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for beta-

lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1211-1233.

Bush K. 1988. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinics. *Clin Microbiol Rev*

1(1):109-23.

Cafini F, Aguilar L, González N, Giménez MJ, Torrico M, Alou L, Sevillano D,

Vallejo P, Prieto J. 2007. *In vitro* effect of the presence of human albumin or human serum on the bactericidal activity of daptomycin against strains with the main resistance phenotypes in gram-positives. *J Antimicrob Chemother* **59**:1185–1189.

Cafini F, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Alou L, Fenoll A, Echevarría O,

Torrico M, González N, Coronel P, Prieto J. 2008. Decrease in bacterial load *versus* resistance selection of pneumococcal subpopulations by beta-lactam physiological concentrations over time: an *in vitro* pharmacodynamic simulation. *Microbial Drug Res* **14**(1):13-21.

Calbo E, Garau J. 2005. Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to

antimicrobial therapy of community-acquired respiratory tract infections. *Respiration* **72**(6):561-71.

Campos J. Género *Haemophilus*: interés clínico y epidemiológico.

[https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/hparain.](https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/hparain.pdf)

pdf

Canut Blasco A, Aguilar Alfaro L, Cobo Reinoso J, Giménez Mestre MJ, Rodríguez-

Gascón A. 2013. Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología:

herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enferm Infecc Microbiol*

Clin. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.04.023>

Carey MJ. 1996. Epiglottitis in adults. *Am J Emerg Med* **14**(4):421–424.

Casey JR, Pichichero ME. 2007. The evidence base for cephalosporin superiority over

penicillin in streptococcal pharyngitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**(3 Suppl):

S39–45.

Casey JR. 2007. Selecting the optimal antibiotic in the treatment of group A beta-

hemolytic streptococci pharyngitis. *Clin. Pediatr (Phila)* **46**(suppl 1):25S–35S.

Cefditoren package insert. www.fda.gov.

Chambers HF. 2006. Penicilina. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds.

Enfermedades infecciosas, principios y práctica, 6th ed. Elsevier España S.A. 281-

293.

Choby BA. 2009. Diagnosis and treatment of streptococcal pharyngitis. *Am Fam*

Physician **79**(5):383-390.

- Clairoux N, Picard M, Brochu A, Rousseau N, Gourde P, Beauchamp D, Parr TR Jr, Bergeron MG, Malouin F.** 1992. Molecular basis of the non- β -lactamase-mediated resistance to β -lactam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:1504-1513.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 7th ed. CLSI document M7-A7. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI document M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Craig WA.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* **26**(1):1-10.
- Craig WA.** 2002. Pharmacodynamics of antimicrobials: general concepts and applications. En: Nightingale CH, Murakawa T, Ambrose PG (eds). Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice. Marcel Dekker. New York. 1-23.

- Craig, WA, Kunin CM.** 1976. Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents. *Annu Rev Med* **27**:287–300.
- Critchley IA, Brown SD, Traczewski MM, Tillotson GS, Janjic N.** 2007. National and regional assessment of antimicrobial resistance among community-acquired respiratory tract pathogens identified in a 2005–2006 U.S. Faropenem surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 4382–4389.
- Cunningham MW.** 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **13**:470-511.
- Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, Pasquier C.** 2002. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2208-2218.
- Dabernat H, Delmas C.** 2012. Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 years of age or less in France, 2001-2008: a retrospective database analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**:2745–2753.
- Dagan R, Klugman KP, Craig WA, Baquero F.** 2001. Evidence to support the rationale that bacterial eradication in respiratory tract infection is an important aim of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* **47**:129–140.
- Darabi A, Hocquet D, Dowzicky MJ.** 2010. Antimicrobial activity against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* collected globally between

2004 and 2008 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Diagn Microbiol Infect Dis* **67**(1):78-86.

De Groot R, Dzoljic-Danilovic G, Van Klingereren B, Goessens WHF, Neyens HJ.

1991. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae*: mechanisms, clinical importance and consequences for therapy. *Eur J Pediatr* **150**:534–546.

Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Holley HP Jr, Rauch A. 1997. Antibiotic

resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of beta-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:292-297.

Dworkin MS, Park L, Borchardt SM. 2007. The changing epidemiology of invasive

Haemophilus influenzae disease, especially in persons > or = 65 years old. *Clin Infect Dis* **44**:810–816.

Ekdahl K, Ahlinder I, Hansson HB, Melander E, Mölsted S, Söderström M, Persson

K. 1997. Duration of 439 nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experiences from the South Swedish Pneumococcal Intervention Project. *Clin. Infect. Dis* **25**:1113-1117.

Faden H, Duffy L, Williams A, Krystofik DA, Wolf J. 1995. Epidemiology of

nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life. *J Infect Dis* **172**:132-135.

- Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D.** 2005. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 beta-lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* **56**:773-776.
- Fenoll A, Aguilar L, Robledo O, Giménez MJ, Tarrago D, Granizo JJ, Gimeno M, Coronel P.** 2007. Influence of the beta-lactam resistance phenotype on the cefuroxime versus cefditoren susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* recovered from children with acute otitis media. *J Antimicrob Chemother* **60**:323–327.
- Fenoll A, Robledo O, Lerma M, Giménez MJ, Cebrián L, Casal J, Aguilar L, Gómez-Lus ML.** 2006. Actividad de cefpodoxima y otros betalactámicos orales frente a *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* con distinta sensibilidad a la penicilina. *Rev Esp Quimioterap* **19**:39-44.
- Finlay J, Miller L, Poupard JA.** 2003. A review of the antimicrobial activity of clavulate. *J Antimicrob Chemother* **52**(1): 8- 23.
- Finn A, Straughn A, Meyer M, Chubb J.** 1987. Effect of dose and food on the bioavailability of cefuroxime axetil. *Biopharm Drug Dispos* **8**:519–526.
- Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D.** 2005. Susceptibility of European beta-lactamase-positive and -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J Antimicrob Chemother* **56**:133–138.
- García-Cobos S, Campos J, Cercenado E, Román F, Lázaro E, Pérez-Vázquez M, de Abajo F, Oteo J.** 2008. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae*

decreased, except for beta-lactamase-negative amoxicillin-resistant isolates, in parallel with community antibiotic consumption in Spain from 1997 to 2007.

Antimicrob Agents Chemother **52**:2760–6.

García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, García-Rey C, Pérez-Vázquez M, Oteo J, de Abajo F. 2007. Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2564-2573.

García-de-Lomas J, Lerma M, Cebrián L, Juan-Bañón JL, Coronel P, Giménez MJ, Aguilar L. 2007. Influence of *Haemophilus influenzae* beta-lactamase production and/or *ftsI* gene mutations on *in vitro* activity of and susceptibility rates to aminopenicillins and second- and third-generation cephalosporins. *Int J Antimicrob Agents* **30**:190-192.

García-de-Lomas J, Lerma M, Cebrián L. 2006. Cefditoren activity against *H. influenzae* with different ampicillin susceptibility phenotypes. Abstracts of the Forty-sixth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA,. Abstract E-111. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

García-Rey C, Aguilar L, Baquero F, Casal L, Dal-Ré R. 2002. Importance of local variations in antibiotic consumption and geographical differences of erythromycin and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **40**: 159-164.

- García-Rodríguez JA, Baquero F, García de Lomas J, Aguilar L.** 1999. Antimicrobial susceptibility of 1,422 *Haemophilus influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain. Results of a 1-year (1996-97) multicenter surveillance study. Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. *Infection* **27**(4-5):265-267.
- García-Rodríguez JA, García-Sánchez JE, Gobernado M, Picazo JJ, Prieto J.** 2006. Antimicrobianos en Medicina 2ª edición. Prous.
- García-Suárez MM, Vázquez F, Méndez FJ.** 2006. *Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: an update. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **24**:512-517.
- Gillespie SH, Voelker LL, Dickens A.** 2002. Evolutionary barriers to quinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **8**: 79–84.k
- Gómez J, Ruiz-Gómez J, Hernández-Cardona JL, Núñez ML, Canteras M, Valdés M.** 1994. Antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: a prospective study in Murcia, Spain, 1983–1992. *Chemotherapy*; **40**: 299–303.
- Gómez-Lus ML, Calvo A, Prieto J.** 2008. Antibióticos quimioterápicos. Generalidades. En: Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A. Velázquez, farmacología básica y clínica. 18ª ed. Editorial Médica Panamericana SA. 791-804.
- Granizo JJ, Giménez MJ, Barberán J, Coronel P, Gimeno M, Aguilar L.** 2006. Efficacy of cefditoren, focusing on *S. pneumoniae* and *H. influenzae* per-pathogen

bacteriological response, in the treatment of lower respiratory tract infections: a pooled analysis of seven clinical trials. *Clin Ther* **28**:2061–2069.

Gruneberg RN. 1980. Antibiotic sensitivities of urinary pathogens, 1971-8. *J Clin Pathol* **33**:853-856.

Hammitt LL, Bruden DL, Butler JC, Baggett HC, Hurlburt DA, Reasonover A, Hennessy TW. 2006 Indirect effect of conjugate vaccine on adult carriage of *Streptococcus pneumoniae*: an explanation of trends in invasive pneumococcal disease. *J Infect Dis* **193**: 1487–1494.

Hasegawa K, Kobayashi R, Takada E, Ono A, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K; Nationwide Surveillance for Bacterial Meningitis. 2006. High prevalence of type b beta-lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. *J Antimicrob Chemother* **57**:1077-1082.

Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sunakawa K, Ubukata K. 2003. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist* **9**:39-46.

Hava DL, LeMieux J, Camilli A. 2003. From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* **50**(4):1103-1110.

Heilmann KP, Rice CL, Miller AL, Miller NJ, Beekmann SE, Pfaller MA, Richter SS, Doern GV. 2005. Decreasing prevalence of beta-lactamase production among

respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2561–2564.

Hoshino T, Sato Y, Toyonaga Y, Hanaki H, Sunakawa K; Drug-Resistant Pathogen Surveillance Group in Pediatric Infectious Disease. 2013. Nationwide survey of the development of drug resistance in the pediatric field in 2007 and 2010: drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* in Japan (second report). *J Infect Chemother* **19**(3):495-503.

Ito M, Hotomi M, Maruyama Y, Hatano M, Sugimoto H, Yoshizaki T, Yamanaka N. 2010. Clonal spread of beta-lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant (BLPACR) strains of non-typeable *Haemophilus influenzae* among young children attending a day care in Japan. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*; **74**(8):901–906.

Jansen WT, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. 2006. Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* **58**:873-877.

Jansen WT, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. 2008. Surveillance study of the susceptibility of *Haemophilus influenzae* to various antibacterial agents in Europe and Canada. *Curr Med Res Opin* **24**(10):2853-61.

Johnson DM, Biedenbach DJ, Beach ML, Pfaller MA, Jones RN. 2000. Antimicrobial activity and *in vitro* susceptibility test development for cefditoren against *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* **37**: 99–105.

- Jones RN, Biedenbach DJ, Croco MA, Barrett MS.** 1998. *In vitro* evaluation of a novel orally administered cephalosporin (cefditoren) tested against 1249 recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **31**: 573–8.
- Jones RN, Jacobs MR, Washington JA, Pfaller MA.** 1997. A 1994-95 survey of *Haemophilus influenzae* susceptibility to ten orally administered agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* **27**:75-83.
- Jorgensen JH.** 1992. Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Infect Dis* **14**:1119–1123.
- Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M.** 2004. Genetic and molecular characterization of beta-lactamase negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1630–1639.
- Kaye CM, Allen A, Perry S, McDonagh M, Davy M, Storm K, Bird N, Dewit O.** 2001. The clinical pharmacokinetics of a new pharmacokinetically enhanced formulation of amoxicillin/clavulanate. *Clin Ther* **23**:578-584.
- Kim IS, Ki CS, Kim S, Oh WS, Peck KR, Song JH, Lee K, Lee NY.** 2007. Diversity of ampicillin resistance genes and antimicrobial susceptibility patterns in *Haemophilus influenzae* strains isolated in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2):453-460.

- Kwon Y.** 2001. Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists. Hingham, MA, USA: Kluwer Academia Publishers. 105-119.
- Labia R, Peduzzi J.** 1978. Kinetics of β -lactamase inhibition by clavulanic acid. *Biochem Biophys Acta* **S26**: 572-579.
- Lavoie GY, Bergeron MG.** 1985. Influence of four modes of administration on penetration of aztreonam, cefuroxime, and ampicillin into interstitial fluid and fibrin clots and on in vivo efficacy against *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* **28**:404–412.
- Leder RD, Carson DS.** 1997. Cefuroxime axetil (ceftin): a brief review. *Infect Dis Obstet Gynecol* **5**(3):211-4.
- Lieberthal AS, Carroll AE, Chonmaitree T, Ganiats TG, Hoberman A, Jackson MA, Joffe MD, Miller DT, Rosenfeld RM, Sevilla XD, Schwartz RH, Thomas PA, Tunkel DE.** 2013. The diagnosis and management of acute otitis media. *Pediatrics* **131**(3):e964-99.
- Löwdin E, Cars O, Odenholt I.** 2002. Pharmacodynamics of amoxicillin/ clavulanic acid against *Haemophilus influenzae* in an *in vitro* kinetic model: a comparison of different dosage regimens including a pharmacokinetically enhanced formulation. *Clin Microbiol Infect* **8**:646–653.
- Lulitanond A, Chanawong A, Pienthaweechai K, Sribenjalux P, Tavichakorntrakool R, Wilailuckana C, Puang-Ngern P, Saetung P.** 2012.

Prevalence of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolated from patients of a teaching hospital in Thailand. *Jpn J Infect Dis* **65**(2):122-5.

MacGowan AP, Noel AR, Rogers CA, Bowker KE. 2004. Antibacterial effects of amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains for which MICs are high, in an *in vitro* pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2599–603.

MacGowan AP, Wise R. 2001. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother* **48**: 17-28.

Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, et al. 2007. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* **44**Suppl 2: S27–72.

Marco F, García-de-Lomas J, García-Rey C, Bouza E, Aguilar L, Fernández-Mazarrasa C; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. 2001. Antimicrobial susceptibilities of 1,730 *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Spain in 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother*.**45**:3226-3228.

Margolis E, Yates A, Levin BR. 2010. The ecology of nasal colonization of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*: the role of competition and interactions with host's immune response. *BMC Microbiol* **10**:59.

- Marín M, Gudiol F.** 2003. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21**:42-55.
- Markowitz SM.** 1980. Isolation of an ampicillin-resistant, non-beta-lactamase producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* **17**:80–83.
- Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER.** 2004. Group A streptococci among school-aged children: clinical characteristics and the carrier state. *Pediatrics* **114**:1212-1219.
- Marx MA, Fant WK.** 1988. Cefuroxime axetil. *Drug Intell Clin Pharm* **22**(9):651-8.
- Matic V, Bozdogan B, Jacobs MR, Ubukata K, Appelbaum PC.** 2003. Contribution of betalactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in beta-lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* **52**: 1018–1021.
- Medeiros AA, O'Brien TF.** 1975. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type B possessing a TEM-type beta-lactamase but little permeability barrier to ampicillin. *Lancet* **i**:716-719.
- Melegaro A, Choi Y, Pebody R, Gay N.** 2007. Pneumococcal carriage in United Kingdom families: estimating serotype-specific transmission parameters from longitudinal data. *Am J Epidemiol* **166**:228-235.

- Mendelman PM, Chaffin DO, Kalaitzoglou G.** 1990. Penicillin binding proteins and ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* **25**:525–534.
- Moellering RC, Eliopoulos GM.** 2006. Principios de la terapia antiinfecciosa. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Enfermedades infecciosas, principios y práctica, 6th ed. Elsevier España S.A.
- Moreillon P, Markiewicz Z, Nachman S, Tomasz A.** Two bactericidal targets for penicillin in pneumococci: autolysis-dependent and autolysis-independent killing mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* **34**(1):33-9.
- Mueller M, de la Peña A, Derendorf H.** 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:369 - 377.
- Mufson, MA.** 2006. *Streptococcus pneumoniae*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Enfermedades infecciosas, principios y práctica, 6th ed. Elsevier España S.A. 1539-1550.
- Mulford D, Mayer M, Witt G.** 2000a. Effect of age and gender on the pharmacokinetics of cefditoren. Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. abstr. 310. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Mulford D, Mayer M, Witt G.** 2000b. Effect of renal impairment on the pharmacokinetic of cefditoren. Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. abstr. 311. American Society for Microbiology, Washington, DC.

- Murphy TF.** 2006. *Haemophilus influenzae*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Enfermedades infecciosas, principios y práctica, 6th ed. Elsevier España S.A. 2661-2669.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** 2006. Microbiología Médica. 5ª ed. Elsevier, España. 237-258, 367-376.
- Musher DM.** 2006. *Streptococcus pneumoniae*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Enfermedades infecciosas, principios y práctica, 6th ed. Elsevier España S.A. 2392-411.
- Musher DM.** *Haemophilus* species. In: Baron S, ed. *Medical Microbiology*, 4th edition. Galveston. 1996.
- Nielsen EI, Cars O, Friberg LE.** 2011. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization. *Antimicrob. Agents Chemother* **55**:4619–4630.
- Niki Y, Hanaki H, Matsumoto T, et al.** 2011. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the Japanese Society of Chemotherapy in 2008: general view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J Infect Chemother* **17**(4):510-523.
- Nimmo GR, Bell JM, Collignon PJ; Australian Group for Antimicrobial Resistance.** 2003. Fifteen years of surveillance by the Australian Group for Antimicrobial Resistance (AGAR). *Commun Dis Intell* **27**:S47–S54.

- Nissinen A, Grönroos P, Huovinen P, Herva E, Katila ML, Klaukka T, Kontiainen S, Liimatainen O, Oinonen S, Mäkelä PH.** 1995. Development of beta-lactamase-mediated resistance to penicillin in middle-ear isolates of *Moraxella catarrhalis* in Finnish children, 1978–1993. *Clin Infect Dis* **21**:1193–1196.
- Nix DE, Matthias KR, Ferguson EC.** 2004a. Effect of ertapenem protein binding on killing of bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3419-3424.
- Nuermberger EL, Bishai WR.** 2004. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*: what does the future hold? *Clin Infect Dis* **38** Suppl 4: S363–371.
- O'Brien TF, Acar JF, Medeiros AA, Norton RA, Goldstein F, Kent RL.** 1978. International comparison of prevalence of resistance to antibiotics. *JAMA* **239**(15):1518-1523.
- O'Callaghan CH, Kirby SM, Morris A, Waller RE, Duncombe RE.** 1972. Correlation between hydrolysis of the -lactam bond of the cephalosporin nucleus and expulsion of the 3-substituent. *J Bacteriol* **110**:988-991.
- Odutola A, Antonio M, Owolabi O, Bojang A, Foster-Nyarko E, Donkor S, Adetifa I, Taylor S, Bottomley C, Greenwood B, Ota M.** 2013. Comparison of the prevalence of common bacterial pathogens in the oropharynx and nasopharynx of gambian infants. *PLoS One* **23**;8(9):e75558.
- Osaki Y, Sanbongi Y, Ishikawa M, Kataoka H, Suzuki T, Maeda K, Ida T.** 2005. Genetic approach to study the relationship between penicillin-binding protein 3 mutations and *Haemophilus influenzae* β -lactam resistance by using site-directed

mutagenesis and gene recombinants. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(7):2834-2839.

Oteo J, Alós JI, Gómez-Garcés JL. 2001. Sensibilidad *in vitro* actual de los patógenos respiratorios bacterianos más frecuentes: implicaciones clínicas. *Med Clin* **116**:541-549.

Palmu AAI, Herva E, Savolainen H, Karma P, Makela PH, Kilpi TM. 2004. Association of clinical signs and symptoms with bacterial findings in acute otitis media. *Clin Infect Dis* **38**:234–242.

Park C, Kim KH, Shin NY, Byun JH, Kwon EY, Lee JW, Kwon HJ, Choi EY, Lee DG, Sohn WY, Kang JH. 2013. Genetic diversity of the *ftsI* gene in β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant and β -lactamase-producing amoxicillin-/clavulanic acid-resistant nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* strains isolated from children in South Korea. *Microb Drug Resist* **19**(3):224-230.

Parr TR Jr, Bryan LE. 1984. Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **25**:747–753.

Peltola H. 2000. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* **13**(2): 302-317.

- Peric M, Browne FA, Jacobs MR, Appelbaum PC.** 2003. Activity of nine oral agents against gram-positive and gram-negative bacteria encountered in community-acquired infections: use of pharmacokinetic/pharmacodynamic breakpoints in the comparative assessment of beta-lactam and macrolide antimicrobial agents. *Clin Ther* **25**(1):169-77.
- Perlstein D, Liebmann AJ.** 1945. The *in vitro* protection of penicillin from penicillinase. *Science* **102**:174-175.
- Pichichero ME, Casey JR, Mayes T, Francis AB, Marsocci SM, Murphy AM, Hoeger W.** 2000. Penicillin failure in streptococcal tonsillopharyngitis: causes and remedies. *Pediatr Infect Dis J* **19**: 917–923.
- Pittman M.** 1931. Variation and type specificity in the bacterial species *H influenzae*. *J Exp Med* **53**:471-475.
- Popick AC, Crouthamel WG, Bekersky I.** 1987. Plasma protein binding of ceftriaxone. *Xenobiotica* **17**:1139-1145.
- Puig C, Calatayud L, Martí S, Tubau F, Garcia-Vidal C, Carratalà J, Liñares J, Ardanuy C.** 2013. Molecular epidemiology of nontypeable *Haemophilus influenzae* causing community-acquired pneumonia in adults. *PLoS One* **13**:8(12).
- Raymond J, Armand-Lefevre L, Moulin F, Dabernat H, Commeau A, Gendrel D, Berche P.** 2001. Nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in children living in an orphanage. *Pediatr Infect Dis J* **20**:779-784.

- Raymond J, Le Thomas I, Moulin F, Commeau A, Gendrel D, Berche P.** 2000. Sequential colonization by *Streptococcus pneumoniae* of healthy children living in an orphanage. *J Infect Dis* **181**(6):1983-1988.
- Reading C, Cole M.** 1977. Clavulanic acid: a β -lactamase-inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* **11**: 852-857.
- Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E.** 2004. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. *Clin Infect Dis* **38**(5):632-639.
- Rodríguez-Avial C, Picazo JJ.** 1996. En: García-Rodríguez JA, Picazo JJ (eds). Microbiología Médica vol I. Mosby, Madrid. 279-285.
- Rovers MM, Schilder AGM, Zielhuis GA, Rosenfeld RM.** 2004. Otitis media. *Lancet* **363**:465-473.
- Rozen DE, McGee L, Levin BR, Klugman KP.** 2007. Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 412–416.
- Rubach MP, Bender JM, Mottice S, Hanson K, Weng HY, Korgenski K, Daly JA, Pavia AT.** 2011. Increasing incidence of invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults, Utah, USA. *Emerg Infect Dis* **17**:1645–1650.

- Rubin LG, Medeiros AA, Yolken RH, Moxon ER.** 1981. Ampicillin treatment failure of apparently beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type b meningitis due to novel beta-lactamase. *Lancet* **ii**:1008-1010.
- Rudan I, Tomaskovic L, Boschi-Pinto C, Campbell H.** 2004. Global estimate of the incidence of clinical pneumonia among children under five years of age. *Bulletin of the World Health Organization* **82**:895–903.
- Sakata H, Toyonaga Y, Sato Y, Hanaki H, Nonoyama M, Oishi T, et al.** Nationwide survey of the development of drug-resistance in the pediatric field: drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* in Japan. *J Infect Chemother* **15**:402–409.
- Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Alves CR, Carriço JA, Saldanha J, Almeida JS, Santos-Sanches I, de Lencastre H.** 2008. High rates of transmission and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* within a day-care center revealed in a longitudinal study. *J Clin Microbiol* **46**:225-234.
- Sá-Leão R, Tomasz A, Santos Sanches I, de Lencastre H.** 2002. Pilot study of the genetic diversity of the pneumococcal nasopharyngeal flora among children attending day care centers. *J Clin Microbiol* **40**:3577-3585.
- Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K.** 2006. Molecular evolution of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2487–2492.

- Schmidt S, Röck K, Sahre M, Burkhardt O, Brunner M, Lobmeyer MT, Derendorf H.** 2008. Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(11):3994-4000.
- Scott LJ, Ormrod D, Goa KL.** 2001. Cefuroxime axetil: an updated review of its use in the management of bacterial infections. *Drugs* **61**(10):1455-500.
- Scriver SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Brunton J, McGeer A, Moore TC, Witwicki E.** 1994. Determination of susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:1678-1680.
- Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF.** 2002. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **347**:465-471.
- Sethi S, Murphy TF.** 2004. Acute exacerbations of chronic bronchitis: new developments concerning microbiology and pathophysiology-impact on approaches to risk stratification and therapy. *Infect Dis Clin N Am* **18**:861-882.
- Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, Echevarría O, Cafini F, Valero E, Fenoll A, Prieto J.** 2006. Effects of antimicrobials on the competitive growth of *Streptococcus pneumoniae*: a pharmacodynamic *in vitro* model approach to selection of resistant populations. *J Antimicrob Chemother* **58**:794-801.
- Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, González N, Torrico M, Cafini F, Fenoll A, Coronel P, Prieto J.** 2008. High protein binding and cidal activity

against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: a cefditoren *in vitro* pharmacodynamic simulation. *PLoS ONE* **3**: e2717.

Sevillano D, Giménez MJ, Alou L, Aguilar L, Cafini F, Torrico M, González N, Echeverría O, Coronel P, Prieto J. 2007. Effects of human albumin and serum on the *in vitro* bactericidal activity of cefditoren against penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **60**(1):156-8.

Sevillano D, Giménez MJ, Cercenado E, Cafini F, Gené A, Alou L, Marco F, Martínez-Martínez L, Coronel P, Aguilar L. 2009. Genotypic *versus* phenotypic characterization, with respect to beta-lactam susceptibility, of *Haemophilus influenzae* isolates exhibiting decreased susceptibility to beta-lactam resistance markers. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(1):267-70.

Shah RK, Stocks C. 2010. Epiglottitis in the United States: national trends, variances, prognosis, and management. *Laryngoscope* **120**(6):1256-62.

Shulman ST, Bisno AL, Clegg HB, Gerber MA, Kaplan EL, Lee G, Martin JM, Van Beneden C. 2012. Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis: 2012 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **55**(10):e86-102.

Shulman ST, Gerber MA. 2004. So what's wrong with penicillin for strep throat? *Pediatrics* **113**:1816–1819.

- Simon HJ, Sakai W.** 1963. Staphylococcal antagonism to penicillin-G therapy of hemolytic streptococcal pharyngeal infection. Effect of oxacillin. *Pediatrics* **31**:463-469.
- Skaare D, Allum AG, Anthonisen IL, Jenkins A, Lia A, Strand L, Tveten Y, Kristiansen BE.** 2010. Mutant *ftsI* genes in the emergence of penicillin-binding protein-mediated beta-lactam resistance in *Haemophilus influenzae* in Norway. *Clin Microbiol Infect* **16**(8):1117-24.
- Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP.** 1933. *Lancet* **2**: 66.
- Smith-Vaughan HC, Leach AJ, Shelby-James TM, Kemp DJ, Mathews JD.** 1996. Carriage of multiple ribotypes of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* in aboriginal infants with otitis media. *Epidemiol Infect* **116**:177-183.
- Sommers DK, Van Wyk M, Williams PE, Harding SM.** 1984. Pharmacokinetics and tolerance of cefuroxime axetil in volunteers during repeated dosing. *Antimicrob Agents Chemother* **25**:344–347.
- Song JH.** 2003. Introduction: the goals of antimicrobial therapy. *Int J Infect Dis* **7** Suppl 1:S1-4.
- Soriano, F.** 2006. Fundamentos farmacocinéticos y farmacodinámicos. En: Guerrero A. Uso adecuado de antimicrobianos en atención primaria. Science Tools, S.L. 51-82.
- Stjernquist-Desatnik A, Holst E.** 1999. Tonsillar microbial flora: comparison of recurrent tonsillitis and normal tonsils. *Acta Otolaryngol* **119**: 102–106.

The United Nations Children's Fund (UNICEF)/World Health Organization

(WHO). 2006. Pneumonia: The forgotten killer of children.

http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9280640489_eng.pdf.

Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL,

Harrison LH, Farley MM, Reingold A, Bennett NM, Craig AS, Schaffner W,

Thomas A, Lewis MM, Scallan E, Schuchat A; Emerging Infections Programs

Network. 2011. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med*

364(21):2016-25.

Tipper DJ. 1979. Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Rev Infect Dis* **1**:39-54.

Tristram SG, Jacobs MR, Appelbaum PC. 2007. Antimicrobial resistance in

Haemophilus influenzae. *Clin Microbiol Rev* **20(2):368-389.**

Tristram SG, Nichols S. 2006. A multiplex PCR for beta-lactamase genes of

Haemophilus influenzae and description of a new *bla*TEM promoter variant. *J*

Antimicrob. Chemother **58**:183-185.

Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley

RJ. 2004. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin*

Infect Dis **39**:1267-1284.

Tunkel AR, Scheld WM. 2006. Meningitis aguda. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin

R, eds. Enfermedades infecciosas, principios y práctica, 6th ed. Elsevier España

S.A.. 1083-1126.

- Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inoue M, Konno M.** 2001. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1693–1699.
- Vree TB, Dammers E, Exler PS.** 2003. Identical pattern of highly variable absorption of clavulanic acid from four different oral formulations of co-amoxiclav in healthy subjects. *J Antimicrob Chemother* **51**:373–378.
- Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Levine OS, Hajjeh R, Mulholland K, Cherian T.** 2009. Burden of diseases caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**(9693): 903-911.
- Wellington K, Curran MP.** 2004. Cefditoren pivoxil: a review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs* **64**(22):2597-2618.
- World Health Organization (WHO).** 2005. *Haemophilus influenzae* type B (HiB). WHO fact sheet no. 294, December 2005. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs294/en/index.html>.
- Wright DH, Brown GH, Peterson ML, Totschafer JC.** 2000. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J Antimicrob Chemother* **46**:669-683.
- Zoorob R, Sidani MA, Fremont RD, Kihlberg C.** 2012. Antibiotic use in acute upper respiratory tract infections. *Am Fam Physician* **86**(9):817-22.

Summary

INTRODUCTION

Haemophilus influenzae is one of the most important bacterial pathogens of respiratory tract infections in children and adults and is responsible for significant morbidity and mortality worldwide. Increased resistance to several antibiotics of first and second line used in the treatment of these infections is a cause of concern. For β -lactam antibiotics, resistance in *H. influenzae* is generally predicted by susceptibility to ampicillin, where the majority of the resistant isolates produce β -lactamases or have mutations in the *ftsI* gene encoding PBP3.

Until a few years ago, β -lactamase production (BLPAR strains) has historically predominated, while mutations in the *ftsI* gene (BLNAR strains) showed a lower rate with a variable prevalence depending on geographic area. However, BLPAR strains prevalence is stabilizing or decreasing at present, and, in turn, the percentage of BLNAR and BLPACR strains is increasing.

The increase in the prevalence of BLNAR and BLPACR phenotypes throughout recent years increase the resistance to amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid and various cephalosporins, which shows important implications for community acquired respiratory tract infections treatment.

The dissemination of BLNAR and BLPACR phenotypes has led to questions about the clinical activity of old and new β -lactams. Clinical trials will probably not include enough number of patients with these strains, precluding correlations of these phenotypes with therapeutic activity. Experimental pharmacodynamic simulations mimicking physiological concentrations of antimicrobials can be used as an alternative

approach to explore the bactericidal activity of different compounds against these types of isolates.

Thus, employing a computerized two-compartment pharmacodynamic model, two independent studies were performed to explore the activity of various β -lactams, including new alternatives such as cefditoren 400 mg and amoxicillin/clavulanic acid extended release (XR) (2000/125 mg), against resistant phenotypes of *H. influenzae*. Finally, using common methodology, a study was conducted to assess the activity of 3 β -lactams on a mixed population consisting of common respiratory tract isolates simulating a nasopharyngeal niche. Cefditoren is a third-generation oral cephalosporin with an intrinsic activity similar to cefotaxime against penicillin resistant *S.pneumoniae* and ampicillin-resistant *H. influenzae*, which has demonstrated clinical and bacteriological efficacy in the treatment of lower respiratory tract infections. Amoxicillin/clavulanic acid XR provides immediate release of clavulanic acid and amoxicillin (875 mg), as well as sustained release of amoxicillin (1125 mg), thus maintaining higher serum concentrations of amoxicillin with a $T_{>MIC}$ higher than that achieved with conventional formulations.

- STUDY 1. Adequacy of breakpoints to define non-susceptibility for all *H. influenzae* resistance phenotypes from a pharmacodynamic point of view.

Objectives: to investigate the bactericidal activity, against *H. influenzae* strains exhibiting different resistance phenotypes, of simulated serum concentrations obtained in humans after administration of 400 mg of cefditoren twice daily, 500 mg of

cefuroxime twice daily, 875/125 mg of amoxicillin/clavulanic acid twice daily and 875/125 mg of amoxicillin/clavulanic acid three times daily.

Methods: an *in vitro* computerized pharmacodynamic simulation was carried out and colony counts determined over 24 h. Four *H. influenzae* strains were used, one BLNAS and three ampicillin-resistant strains following CLSI and BSAC breakpoints: one BLPAR strain with a MIC of amoxicillin/clavulanic acid of 0.5 µg/ml, one BLNAR strain with ampicillin MIC of 16 µg/ml and one BLPACR with a MIC of amoxicillin/clavulanic acid of 4 µg/ml. All strains were susceptible to cefuroxime and amoxicillin/clavulanic acid according to current CLSI breakpoints, but BLNAR and BLPACR strains were resistant according to BSAC breakpoints. All strains exhibited cefditoren MIC ≤0.12 µg/ml.

Results: bacterial counts BLNAR and BLPACR strains were ≤6 log₁₀ reduced with all antibiotics tested at 12 and 24 h. Against BLNAR and BLPACR strains, cefditoren and cefuroxime exhibited bactericidal activity (≥3 log₁₀) at 12 and 24 h, but the two amoxicillin/clavulanic acid regimens exhibited negligible initial inocula reductions.

Conclusions: cefditoren and cefuroxime exhibited the highest bactericidal activity maintained over time against resistance phenotypes of *H. influenzae*, regardless of β-lactamase production and/or the mutations in the *ftsI* gene. From the pharmacodynamic perspective, BSAC breakpoints seem more adequate to define or detect BLNAR strains.

- **STUDY 2. Evaluation of β -lactamase production in the activity of new alternatives against resistance phenotypes of *H. influenzae*.**

Objectives: to explore bactericidal activity of total and free serum simulated concentrations after the oral administration of 400 mg of cefditoren twice daily *versus* the oral administration of amoxicillin/clavulanic acid extended release formulation (2,000/125 mg) twice daily against *H. influenzae*. Total and free serum concentrations were simulated to explore the theoretical influence of protein binding on the above-mentioned bactericidal activity,

Methods: a computerized pharmacodynamic simulation was performed and colony counts and β -lactamase activity were determined over 48 h. Three strains were used: one BLNAS strain, one BLNAR strain (also resistant to amoxicillin/clavulanic acid) and one BLPACR strain, with cefditoren MICs of ≤ 0.12 $\mu\text{g/ml}$ and amoxicillin/clavulanic acid MICs of 2, 8, and 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Results: against the BLNAS and BLNAR strains, bactericidal activity was obtained from 6 h on with either total and free cefditoren or amoxicillin/clavulanic acid. Against the BLPACR strain, free cefditoren showed bactericidal activity from 8 h on. In amoxicillin/clavulanic acid simulations the increase in colony counts from 4 h on occurred in parallel with the increase in β -lactamase activity for the BLPACR strain. Since both BLNAR and BLPACR strains exhibited the same MIC, this was due to the significantly lower ($P < 0.012$) amoxicillin concentrations from 4 h on in simulations with β -lactamase positive *versus* negative strains, thus decreasing $T_{>\text{MIC}}$.

Conclusions: from a pharmacodynamic point of view, the theoretical amoxicillin $T_{>MIC}$ against strains with elevated ampicillin or amoxicillin/clavulanic acid MICs should be considered with caution since the presence of β -lactamase inactivates the antibiotic, thus rendering inaccurate theoretical calculations. The experimental bactericidal activity of cefditoren is maintained over the dosing interval regardless of the presence of a mutation in the *ftsI* gene or β -lactamase production.

- STUDY 3. β -lactam effects on mixed cultures of common respiratory isolates.

Objectives: to explore the effect of physiological concentrations of amoxicillin 875 mg three times daily, amoxicillin/clavulanic acid 875 mg three times daily and 400 mg cefditoren twice daily on the evolution over time of a bacterial load containing common pharyngeal isolates simulating a nasopharyngeal niche.

Methods: a computerized pharmacodynamic simulation was performed and colony counts and β -lactamase activity were determined over 24 h. Strains and MICs ($\mu\text{g/ml}$) of amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid and cefditoren were: *S. pyogenes* (0.03, 0.03 and 0.015), *S. pneumoniae* (2, 2 and 0.25), a BLPAR (>16, 2 and 0.06) and BLPCR, (>16, 8 and 0.06). Mixture of identical 1:1:1:1 volumes of each bacterial suspension were prepared yielding an inocula of 4×10^6 cfu/ml. Antibiotic concentrations were measured both in bacterial and in bacteria-free antibiotic simulations.

Results: β -lactamase production decreased amoxicillin concentrations and $T_{>MIC}$ against *S. pneumoniae* (from 43.2% to 17.7%) or *S. pyogenes* (from 99.9% to 24.9%),

and eradication was precluded. The presence of clavulanic acid countered this effect of co-pathogenicity, and *S. pyogenes* (but not BLPAR and *S. pneumoniae*) was eradicated. Resistance of cefditoren to TEM-1 β -lactamase avoided this co-pathogenicity effect, and cefditoren eradicated *S. pyogenes* and *H. influenzae* strains ($T_{>MIC} > 58\%$), and reduced in 94% *S. pneumoniae* counts ($T_{>MIC} < 25\%$).

Conclusions: co-pathogenicity seems to be gradual since clavulanic acid countered this effect for strains very susceptible to amoxicillin as *S. pyogenes* but not for strains with amoxicillin MIC values in the limit of susceptibility as *S. pneumoniae*. There is a potential therapeutic advantage for β -lactamase resistant cephalosporins with high activity against β -hemolytic streptococci.

Are β -lactam breakpoints adequate to define non-susceptibility for all *Haemophilus influenzae* resistance phenotypes from a pharmacodynamic point of view?

L. Alou¹, M. J. Giménez¹, D. Sevillano¹, L. Aguilar^{1*}, N. González¹, O. Echeverría¹, M. Torrico¹, P. Coronel² and J. Prieto¹

¹Microbiology Department, School of Medicine, Universidad Complutense, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain; ²Scientific Department, Tedec-Meiji Farma SA, Ctra. M-300, Km. 30 500, 28802 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Received 26 September 2006; returned 21 November 2006; revised 24 November 2006; accepted 16 January 2007

Objectives: To investigate the bactericidal activity, against *Haemophilus influenzae* strains exhibiting different resistance phenotypes, of simulated serum concentrations obtained in humans after administration of 400 mg of cefditoren twice daily, 500 mg of cefuroxime twice daily, 875/125 mg of co-amoxiclav twice daily or 875/125 mg of co-amoxiclav three times daily.

Methods: An *in vitro* computerized pharmacodynamic simulation was carried out and colony counts determined over 24 h. Four *H. influenzae* strains were used, one ampicillin-susceptible strain (Strain 1) and three ampicillin-resistant strains following CLSI and BSAC breakpoints: one β -lactamase-positive strain with an MIC of co-amoxiclav of 0.5 mg/L (Strain 2), one β -lactamase-negative ampicillin-resistant strain (BLNAR; ampicillin MIC = 16 mg/L) (Strain 3) and one β -lactamase-positive strain with an MIC of co-amoxiclav of 4 mg/L (Strain 4). All strains were susceptible to cefuroxime and co-amoxiclav according to current CLSI breakpoints, but Strains 3 and 4 were resistant according to BSAC breakpoints. All strains exhibited cefditoren MIC \leq 0.12 mg/L.

Results: Bacterial counts of Strains 1 and 2 were $\geq 6 \log_{10}$ reduced with all antibiotics tested at 12 and 24 h. Against Strains 3 and 4, \log_{10} reductions at 12 and 24 h were significantly higher for cefditoren versus cefuroxime ($P < 0.01$) (although both exhibited bactericidal activity, i.e. $\geq 3 \log_{10}$ reduction) and versus the two co-amoxiclav regimens ($P < 0.001$) (that exhibited negligible initial inocula reductions).

Conclusions: Cefditoren exhibited the highest bactericidal activity maintained over time against ampicillin-resistant *H. influenzae*, regardless of β -lactamase production and/or BLNAR phenotype. From the pharmacodynamic perspective, BSAC breakpoints seem more adequate to define or detect BLNAR strains.

Keywords: cefditoren, co-amoxiclav, *H. influenzae*

Introduction

Despite the use of anti-*Haemophilus influenzae* b vaccine that has decreased the incidence in invasive disease, *H. influenzae* remains a key aetiological agent of upper and lower respiratory tract infections in humans (its natural exclusive host). This change in *H. influenzae* ecology has been accompanied by changes in resistance phenotypes: the β -lactamase production phenotype that has been related to antibiotic consumption,^{1,2} the β -lactamase-negative ampicillin-resistant phenotype

(BLNAR) that has appeared and increased worldwide in the last decade^{3–7} and the β -lactamase-positive amoxicillin/clavulanate-resistant (BLPACR) phenotype that is nowadays anecdotal.^{8–10}

In Spain, although β -lactamase production in *H. influenzae* was found at a constant rate of ~ 20 –25% in successive nationwide surveillance studies (SAUCE Program) carried out in 1996–97,¹¹ 1998–99¹² and 2001–02,¹³ the BLNAR phenotype prevalence was 9% and 4.5% in the 1998–99 and 2001–02 surveillances, respectively, and the BLPACR phenotype was not

*Corresponding author. Tel/Fax: +34-91-3941511; E-mail: laguilar@med.ucm.es

detected in the first surveillance and anecdotal (0.1%) in the other two.

The increase and/or appearance of these new BLNAR and BLPACR phenotypes raises the question of the clinical activity of old and new β -lactams against them.

Cefditoren is a third-generation oral cephalosporin with an intrinsic activity similar to cefotaxime against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*¹⁴ and ampicillin-resistant *H. influenzae*,¹⁵ which has demonstrated clinical and bacteriological efficacy in the treatment of lower respiratory tract infections.^{16,17}

Since efficacy clinical trials will not include enough patients infected by BLNAR or BLPACR strains to reach conclusions, an experimental pharmacodynamic approach mimicking physiological concentrations after standard doses can be used to explore the antibiotic activity and the adequacy of breakpoints predicting bactericidal activity and/or eradication. In this study, a pharmacodynamic simulation in a computerized device was carried out with the new third-generation cephalosporin cefditoren in comparison with two well-known β -lactams (cefuroxime and co-amoxiclav) against four *H. influenzae* strains with different ampicillin resistance phenotypes (one susceptible strain, one BLNAR and two β -lactamase-producing strains) susceptible to study drugs.

Materials and methods

Strains

Four *H. influenzae* isolates were used throughout this study. MICs of ampicillin were 0.03 mg/L for Strain 1, 4 mg/L for Strain 2, 16 mg/L for Strain 3 (BLNAR phenotype) and 4 mg/L for Strain 4. Strains 2 and 4 were β -lactamase producers, as tested by the chromogenic cephalosporin method (Nitrocefin; Oxoid Ltd, Basingstoke, UK). Strain 3 (BLNAR phenotype) presented an N526K mutation in the *ftsI* gene encoding PBP3, determined by PCR amplification and direct sequencing.¹⁸

Prior to and after the simulation process, MICs were determined three times by the microdilution method following CLSI (formerly NCCLS) recommendations.¹⁹ Modal values were considered.

Antimicrobials

Cefditoren reference standard was supplied by Tedec-Meiji Farma, Madrid, Spain. Ampicillin, cefuroxime, amoxicillin trihydrate and lithium clavulanate laboratory reference standards were supplied by GlaxoSmithKline (Worthing, UK).

In vitro kinetic model

A previously described two-compartment dynamic model was used to expose bacteria to changing study drug concentrations, avoiding the dilution of the bacterial inoculum together with the drug.²⁰ The central compartment consists of a spinner flask, the lumina of the capillaries within the dialyser (FX50 class; Fresenius Medical Care S.A., Barcelona, Spain) and the tubing in-between. The infectious site was represented by the extra-capillary space of the dialyser unit combined with the intra-dialyser circulating tubing. The high surface-area-to-volume ratio of the dialysis unit ($>200 \text{ cm}^2/\text{mL}$) guarantees a rapid

equilibration of the concentration of the antimicrobial agent between the two compartments.

Before each experiment, the central compartment was filled with growth medium consisting of Mueller-Hinton broth supplemented with 15 mg/L nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), 15 mg/L haemin and 5 mg/mL yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). The exponential decay of antibiotic concentrations was achieved by a continuous dilution-elimination process using computerized peristaltic pumps (Masterflex; Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA) set to simulate half-lives of co-amoxiclav,²⁰ cefditoren^{21,22} and cefuroxime²³ in human serum. In control drug-free simulations, the rate of peristaltic pumps was fixed to 1 mL/min. The flow rates in the peristaltic pumps were controlled using Win Lin software v.2 (Masterflex; Cole-Parmer Instrument Co.). Additional pumps circulated the antimicrobial/medium mixture at a rate of 50 mL/min between the central and peripheral compartments and at 25 mL/min within the extra-capillary space through external tubing. A computer-controlled syringe pump (402 Dilutor Dispenser; Gilson S.A., Villiers-le-Bel, France) allowed the simulation of drug concentrations by infusion of the drug into the central compartment until the maximum concentration achieved in serum (C_{\max}) was reached. Both compartments were maintained at 37°C during the simulation process.

Kinetic simulations

Pharmacokinetic profiles in serum after oral cefditoren-pivoxil 400 mg twice daily,^{21,22} cefuroxime-axetil 500 mg twice daily,^{23,24} co-amoxiclav 875/125 mg twice daily^{25–28} and co-amoxiclav 875/125 mg three times daily^{25–28} were simulated over 24 h. The target total drug pharmacokinetic parameters, based on mean values reported in humans, were $C_{\max} = 4.20 \text{ mg/L}$, T_{\max} (time to obtained C_{\max}) = 2.75 h and $t_{1/2}$ (half-life) = 1.55 h for cefditoren,^{21,22} and $C_{\max} = 7.70 \text{ mg/L}$, $T_{\max} = 3.0 \text{ h}$ and $t_{1/2} = 1.10 \text{ h}$ for cefuroxime.²³ For co-amoxiclav combinations, the half-life and T_{\max} of clavulanic acid were employed: $T_{\max} = 1.0 \text{ h}$, and $t_{1/2} = 1.1 \text{ h}$ ^{25,26}; the target C_{\max} for amoxicillin was 10.30 mg/L^{25,27,28} and that for clavulanic acid was 2.40 mg/L.^{25,26}

Measurement of antibacterial effect

A bacterial suspension in Mueller-Hinton broth supplemented with 15 mg/L NAD, 15 mg/L haemin and 5 mg/mL yeast extract from an overnight culture in chocolate agar was allowed to grow to a density of 10^8 cfu/mL , as measured by a UV spectrophotometer (Hitachi U-1100). Sixty millilitres of this inoculum was introduced into the peripheral compartment. Samples (0.5 mL) from the peripheral compartment were collected at 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h and serially diluted in 0.9% sodium chloride. At least four dilutions of each sample were spread onto chocolate agar and incubated overnight for colony counting. The limit of detection was 50 cfu/mL. Each experiment was performed in triplicate.

Pharmacokinetic analysis

For the measurement of simulated antimicrobial concentrations, additional aliquots (0.5 mL) were taken from the peripheral compartment at 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h, and at the

time corresponding to T_{\max} of each antimicrobial. All samples were stored at -50°C until use. Concentrations were determined in triplicate by bioassay using *Morganella morganii* ATCC 8076H as indicator organism for ceftidoren, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 for cefuroxime, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 for amoxicillin and *Klebsiella pneumoniae* NCTC 11228 for clavulanic acid concentrations.²⁹ Plates were inoculated with an even lawn of indicator organism and incubated for 18–24 h at 37°C . Standards and dilutions were prepared in the same broth employed in the pharmacokinetic simulation. Intra-day and inter-day coefficients of variation were 2.3% and 8.2%, respectively, for ceftidoren at a concentration of 0.75 mg/L, 8% and 1.5%, respectively, for amoxicillin at a concentration of 0.3 mg/L, 3% and 4.2%, respectively, for clavulanic acid at a concentration of 0.75 mg/L and 1.4% and 1%, respectively, for cefuroxime at a concentration of 3 mg/L.

Antimicrobial concentrations were analysed by a non-compartmental approach using the WinNonlin Professional program (Pharsight, Mountain View, CA, USA). C_{\max} and T_{\max} were obtained directly from observed data. The AUC was calculated by the trapezoidal rule. The time at which concentrations exceeded the MIC ($t > \text{MIC}$) for each strain was calculated graphically by plotting mean concentrations at each timepoint versus time and expressed as percentage of the dosing interval.

Measurement of β -lactamase activity

β -Lactamase activity was measured by modification of a previously described method.^{30,31} In brief, 0.025 mL of a 500 mg/L solution of nitrocefin was added to 225 μL of samples collected at sampling times for colony counting and incubated for 30 min at 37°C . Afterwards, 0.5 mL of 0.05 M phosphate buffer was added and absorbance at 486 nm (A_{486}) was spectrophotometrically read, using broth without inoculum as baseline absorbance.

Statistical analysis

Differences in \log_{10} colony counts at each sampling time with respect to initial inocula were calculated. Differences between antibiotics for each strain or between strains for each antibiotic were determined at 12 and 24 h by the Student's t -test. $P < 0.01$ was considered statistically significant.

Results

Figure 1 shows target and experimental concentrations of study drugs. Experimental half-life (h), T_{\max} (h) and C_{\max} (mg/L) were 1.7 ± 0.2 , 3.0 ± 0.0 and 4.1 ± 0.3 for ceftidoren, 1.2 ± 0.1 , 3.0 ± 0.0 and 7.7 ± 0.2 for cefuroxime, 1.1 ± 0.0 , 1.0 ± 0.0 and 10.4 ± 0.4 for amoxicillin and 1.2 ± 0.2 , 1.0 ± 0.0 and 2.4 ± 0.5 for clavulanic acid, respectively. AUC_{0-12} (h \times mg/L) was 16.4 ± 1.4 for ceftidoren, 22.2 ± 1.1 for cefuroxime, 24.4 ± 1.3 for amoxicillin twice daily and 5.5 ± 1.1 for clavulanic acid three times daily. AUC_{0-8} was 24.1 ± 1.3 for amoxicillin three times daily and 5.5 ± 1.1 for clavulanic acid three times daily.

Susceptibilities of strains to study drugs are shown in Table 1. The same MIC values were found prior to and after the simulations were carried out.

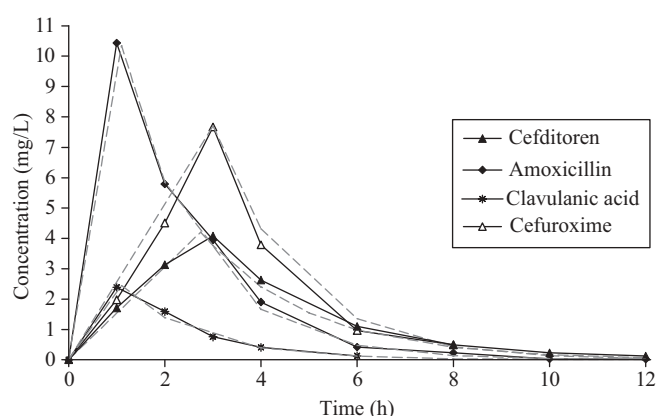


Figure 1. Target (broken line) and experimental concentrations of study drugs.

Table 1 shows $t > \text{MIC}$ (%), \log_{10} cfu/mL and β -lactamase production (absorbance units) at selected timepoints (0, 4, 8 and 12 h). Initial inocula in control curves (antibiotic-free simulations) increased to 8.1 – $8.4 \log_{10}$ cfu/mL for the four strains at 12 and 24 h with β -lactamase activity of ~ 0.5 absorbance units for β -lactamase-producing strains (Strains 2 and 4). No β -lactamase activity was detected with Strains 1 and 3 all throughout controls and experiments.

Against Strains 1 (ampicillin-susceptible) and 2 (β -lactamase-producer with ampicillin MIC = 4 mg/L and susceptible to co-amoxiclav), no significant differences ($P > 0.05$) were found between the four antibiotic regimens with \log_{10} reductions ≥ 6 at 12 h and maintained at 24 h, because $t > \text{MIC}$ was $\geq 49\%$ dosing interval for the four regimens. Bactericidal activity ($\geq 3 \log_{10}$ reduction) at 12 and 24 h was obtained with all antibiotic regimens. β -Lactamase activity was non-detectable at these sampling times for the β -lactamase-producing strain (Strain 2).

\log_{10} reductions at 12 and 24 h were significantly higher for ceftidoren versus cefuroxime ($P < 0.01$) and versus the two co-amoxiclav regimens ($P < 0.001$) against Strain 3 (BLNAR) and Strain 4 (β -lactamase-producer with ampicillin and co-amoxiclav MIC of 4 mg/L). Bactericidal activity ($\geq 3 \log_{10}$ reduction) was obtained at 12 and 24 h with ceftidoren and cefuroxime, but not with both co-amoxiclav regimens (reductions of $\leq 0.8 \log_{10}$ and high final colony counts of $\geq 7 \log_{10}$ at 24 h). More than 5 \log_{10} reductions were obtained with $t > \text{MIC} \sim 100\%$ (ceftidoren), whereas variable results were obtained with $t > \text{MIC} < 35\%$: low reductions for co-amoxiclav regimens ($\leq 1.6 \log_{10}$), but of 3–4 \log_{10} for cefuroxime with only 18% $t > \text{MIC}$ values. β -Lactamase activity of Strain 4 was non-detectable at 12 and 24 h with ceftidoren and cefuroxime (antibiotics exhibiting bactericidal activity) and reached at 24 h values similar to those at time 0 with both co-amoxiclav regimens (0.4 ± 0.0 absorbance units, despite non-detectable β -lactamase activity at 12 h for the three times daily regimen and 0.4 ± 0.0 for the twice daily regimen).

Discussion

Antibiotic activity against *H. influenzae* needs to be assessed, facing the continuous increase in the BLNAR phenotype and the

Table 1. $t > \text{MIC}$ (%), \log_{10} cfu/mL and β -lactamase production (absorbance units) at selected timepoints

			0 h		4 h		8 h		12 h	
Strain	MIC (mg/L)	$t > \text{MIC}$ (%)	\log_{10}	β -lactamase	\log_{10}	β -lactamase	\log_{10}	β -lactamase	\log_{10}	β -lactamase
Cefditoren										
1	0.015	100	7.9 ± 0.0		3.6 ± 0.2		UDL		UDL	
2 ^a	0.007	100	8.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0	3.3 ± 0.3	0.1 ± 0.0	UDL	0.0 ± 0.0	UDL	0.0 ± 0.0
3	0.03	100	8.0 ± 0.1		4.5 ± 0.3		2.5 ± 0.2		UDL	
4 ^a	0.12	99	8.0 ± 0.1	0.3 ± 0.0	4.1 ± 0.3	0.4 ± 0.0	3.0 ± 0.3	0.1 ± 0.1	2.4 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Cefuroxime										
1	0.5	65	8.0 ± 0.1		4.3 ± 0.1		3.2 ± 0.2		2.1 ± 0.1	
2 ^a	0.5	65	8.0 ± 0.1	0.2 ± 0.0	3.7 ± 0.2	0.2 ± 0.0	3.0 ± 0.2	0.1 ± 0.0	1.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0
3	4	18	7.9 ± 0.0		4.8 ± 0.3		3.9 ± 0.3		3.7 ± 0.6	
4 ^a	4	18	8.0 ± 0.2	0.3 ± 0.0	5.0 ± 0.3	0.4 ± 0.1	2.9 ± 0.3	0.1 ± 0.0	4.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0
Amoxicillin/clavulanate 8 h										
1	0.25	98	8.0 ± 0.1		3.8 ± 0.1		2.5 ± 0.2		UDL	
2 ^a	0.5	74	8.0 ± 0.1	0.3 ± 0.0	5.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	3.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0
3	4	33	8.0 ± 0.1		6.2 ± 0.4		6.3 ± 0.2		6.9 ± 0.3	
4 ^a	4	33	8.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0	5.8 ± 0.3	0.2 ± 0.1	6.1 ± 0.5	0.4 ± 0.1	6.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0
Amoxicillin/clavulanate 12 h										
1	0.25	65	8.2 ± 0.0		4.3 ± 0.1		2.8 ± 0.2		UDL	
2 ^a	0.5	49	7.9 ± 0.1	0.3 ± 0.0	5.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.3	0.0 ± 0.0	UDL	0.0 ± 0.0
3	4	22	7.9 ± 0.0		6.3 ± 0.9		6.3 ± 0.0		7.0 ± 0.4	
4 ^a	4	22	7.9 ± 0.0	0.3 ± 0.0	6.6 ± 0.4	0.2 ± 0.1	7.1 ± 0.3	0.4 ± 0.1	7.5 ± 0.4	0.4 ± 0.0

UDL, under detection limit; $t > \text{MIC}$ (%), % dosing interval with serum concentrations exceeding the MIC value.^a β -Lactamase-producing strains.

emergence of the BLPACR phenotype and its potential subsequent dissemination. The evaluation should include the study of the pharmacodynamic profile of oral β -lactams, in commonly used regimens, to see the adequacy of breakpoints defining susceptibility to validate their use in daily practice.

Amoxicillin and co-amoxiclav resistance of the above-mentioned phenotypes depends on changes in PBP3,³² whereas the β -lactamase production in the BLPACR phenotype seems similar to that of the co-amoxiclav-susceptible β -lactamase-producing strains,³² owing to the higher prevalence of the TEM-1 enzyme.

In this study, four strains were used, one ampicillin-susceptible strain and three ampicillin-resistant strains following CLSI³³ and BSAC³⁴ breakpoints: one BLNAR strain (ampicillin MIC = 16 mg/L, while BLNAR has been defined by ampicillin MIC values ≥ 1 mg/L¹⁸ or ≥ 2 mg/L¹³) and two β -lactamase-positive strains (with an ampicillin MIC = 4 mg/L and co-amoxiclav MIC = 0.5 and 4 mg/L). All strains were susceptible to cefuroxime and co-amoxiclav following current CLSI breakpoints (≤ 4 mg/L),³³ but Strains 3 and 4 were resistant to the two antibiotics if BSAC breakpoints (≥ 2 mg/L) are considered. There are no defined CLSI or BSAC breakpoints for cefditoren, but following the suggested breakpoint of ≤ 0.5 – ≤ 1 mg/L,^{35–37} all strains can be considered susceptible because they exhibited MIC values ≤ 0.12 mg/L.

Despite the susceptibility (following CLSI breakpoints) of the four isolates to study drugs, statistically significant differences were found in the activity of cefditoren versus the other

antibiotic regimens tested against Strains 3 and 4, owing to $\geq 5 \log_{10}$ reductions in initial inocula with cefditoren, 3.5–4 \log_{10} with cefuroxime and 0.5–1.5 \log_{10} with co-amoxiclav. Considering these results, BSAC breakpoints seem more adequate from the pharmacodynamic perspective, since these two strains are considered resistant. Similar results with resistant strains (MIC = 5 mg/L) were obtained in a previous study after 12 h exposure to a simulated co-amoxiclav 875/125 mg twice daily regimen.³⁸ Bacterial counts of Strains 1 and 2 (susceptible strains according to both CLSI and BSAC breakpoints) were $\geq 6 \log_{10}$ reduced with all antibiotics tested at 12 and 24 h.

The cut-off of ampicillin concentration defining BLNAR is crucial because mutations of the *ftsI* gene encoding PBP3 have been found in strains exhibiting ampicillin MICs as low as 1 mg/L,¹⁵ which are considered ampicillin-susceptible by CLSI and BSAC criteria. These mutations have also been found in the BLPACR phenotype together with the TEM-1 β -lactamase.³² The pharmacodynamic adequacy of antibiotic regimens against the BLNAR and BLPACR phenotypes should be re-assessed because of the decreased activity of classical anti-*Haemophilus* formulations such as amoxicillin regimens (≤ 875 mg two or three times daily) with or without clavulanic acid (125 mg two or three times daily). However, these ampicillin-resistant phenotypes exhibited MIC₅₀/MIC₉₀ values as low as $\leq 0.015/0.03$ for third-generation cephalosporins such as cefditoren or cefotaxime.¹⁵

The results of this study show that cefditoren exhibited the highest bactericidal activity maintained over time against ampicillin-resistant *H. influenzae*, regardless of β -lactamase

production and/or BLNAR phenotype. From the pharmacodynamic perspective, BSAC breakpoints seem more adequate to define or detect BLNAR strains. Detecting these strains may be important in clinical practice because of the possible increasing prevalence of this phenotype and the lower bacteriological responsiveness of these strains to some common antibiotics. Continuous surveillance exploring whether the incidence of these phenotypes is increasing, and monitoring the presence of *ftsI* mutation in strains with different MIC values, as well as the comparative testing of the pharmacodynamic activity of different antibiotic regimens against these emerging or increasing number of strains reported in the literature should give us a complete picture of the problem and the strategies to counter it.

Acknowledgements

We thank J. García-de-Lomas (Instituto Valenciano de Microbiología; IVAMI) for the supply of the study strains and for sequencing the *ftsI* genes. We also thank M. Gimeno, L. Valdés and J. E. Martín for their critical review of the manuscript. This study was funded by an unrestricted grant from Tedec-Meiji Farma, S.A., Madrid, Spain and GlaxoSmithKline S.A., Madrid, Spain.

Transparency declarations

P. C. is an employee (Scientific Director) of Tedec-Meiji Farma S.A., Madrid, Spain. Rest of the authors: none to declare.

References

- Gómez J, Ruiz-Gómez J, Hernández-Cardona JL *et al.* Antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: a prospective study in Murcia, Spain, 1983–1992. *Chemotherapy* 1994; **40**: 299–303.
- Nissinen A, Gronroos P, Huovinen P *et al.* Development of β -lactamase-mediated resistance to penicillin in middle-ear isolates of *Moraxella catarrhalis* in Finnish children, 1978–1993. *Clin Infect Dis* 1995; **21**: 1193–6.
- Jacobs MR, Bajaksouzian S, Zilles A *et al.* Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 U.S. Surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1901–8.
- Seki H, Kasahara Y, Ohta K *et al.* Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non- β -lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan. *Chemotherapy* 1999; **45**: 15–21.
- Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K *et al.* Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1693–9.
- Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R *et al.* Rapidly increasing prevalence of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1509–14.
- García-de-Lomas J, García-Rey C, López L *et al.* Susceptibility patterns of bacteria causing community-acquired respiratory infections in Spain: the SAUCE project. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50** Suppl S2: 21–6.
- Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G *et al.* Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of β -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 292–7.
- Jones RN, Jacobs MR, Washington JA *et al.* A 1994–95 survey of *Haemophilus influenzae* susceptibility to ten orally administered agents. A 187 clinical laboratory center sample in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; **27**: 75–83.
- Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N *et al.* Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist* 2003; **9**: 39–46.
- García-Rodríguez JA, Baquero F, García de Lomas J *et al.* Antimicrobial susceptibility of 1,422 *Haemophilus influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain. Results of a 1-year (1996–97) multicenter surveillance study. Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. *Infection* 1999; **27**: 265–7.
- Marco F, García-de-Lomas J, García-Rey C *et al.* Antimicrobial susceptibilities of 1,730 *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Spain in 1998–1999. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 3226–8.
- Perez-Trallero E, García-de-la-Fuente C, García-Rey C *et al.* Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1965–72.
- Fenoll A, Giménez MJ, Robledo O *et al.* Activity of cefditoren against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* exhibiting non-susceptibility to penicillins, cephalosporins, macrolides, ketolides or quinolones. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **29**: 224–6.
- García-de-Lomas J, Lerma M, Cebrian L *et al.* Cefditoren activity against *H. influenzae* with different ampicillin susceptibility phenotypes. In: *Abstracts of the Forty-sixth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 2006*. Abstract E-111. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Alvarez-Sala JL, Kardos P, Martínez-Beltrán J *et al.* Clinical and bacteriological efficacy in treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis with cefditoren-pivoxil versus cefuroxime-axetil. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1762–7.
- Granizo JJ, Giménez MJ, Barberán J *et al.* Efficacy of cefditoren, focusing on *S. pneumoniae* and *H. influenzae* per-pathogen bacteriological response, in the treatment of lower respiratory tract infections: a pooled analysis of seven clinical trials. *Clin Ther* 2006; **28**: 2061–9.
- Dabernat H, Delmas C, Seguy M *et al.* Diversity of β -lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2208–18.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Sixth Edition: Approved Standard M7-A6*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.
- Sevillano D, Calvo A, Giménez MJ *et al.* Bactericidal activity of amoxicillin against non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacodynamic model simulating the concentrations obtained with the 2000/125 mg sustained-release co-amoxiclav formulation. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 1148–51.
- Mulford D, Mayer M, Witt G. Effect of age and gender on the pharmacokinetics of cefditoren. In: *Abstracts of the Fortieth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, 2000*. Abstract 310. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Mulford D, Mayer M, Witt G. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of cefditoren. In: *Abstracts of the Fortieth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy,*

Pharmacodynamic simulations and *H. influenzae* breakpoints

Toronto, 2000. Abstract 311. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

23. Finn A, Straughn A, Meyer M *et al.* Effect of dose and food on the bioavailability of cefuroxime axetil. *Biopharm Drug Dispos* 1987; **8**: 519–26.

24. Sommers DK, Van Wyk M, Williams PE *et al.* Pharmacokinetics and tolerance of cefuroxime axetil in volunteers during repeated dosing. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; **25**: 344–7.

25. Vree TB, Dammers E, Exler PS. Identical pattern of highly variable absorption of clavulanic acid from four different oral formulations of co-amoxiclav in healthy subjects. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 373–8.

26. Ferslew KE, Daigneault EA, Aten EM *et al.* Pharmacokinetics and urinary excretion of clavulanic acid after oral administration of amoxicillin and potassium clavulanate. *J Clin Pharmacol* 1984; **24**: 452–6.

27. Fraschini F, Scaglione F, Falchi M *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of amoxicillin plus clavulanic acid after oral administration in man. *J Chemother* 1990; **2**: 171–7.

28. Burkhardt O, Borner K, von der Hoh N *et al.* Single- and multiple-dose pharmacokinetics of linezolid and co-amoxiclav in healthy human volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 707–12.

29. Andrews JM. Microbiological assays. In: Reeves DS, Wise R, Andrews JM *et al.*, eds. *Clinical Antimicrobial Assays*, First Edition. Oxford: Oxford University Press, 1999; 35–44.

30. Martin M, Aguilar L, Balcabao IP *et al.* In-vitro pharmacodynamic simulation of clavulanic acid concentrations: effect on *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* β -lactamase activity. *J Antimicrob Chemother* 1997; **39**: 290–2.

31. Prieto J, Aguilar L, Gimenez MJ *et al.* *In vitro* activities of co-amoxiclav at concentrations achieved in human serum against the

resistant subpopulation of heteroresistant *Staphylococcus aureus*: a controlled study with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 1574–7.

32. Matic V, Bozdogan B, Jacobs MR *et al.* Contribution of β -lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in β -lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 1018–21.

33. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2005.

34. MacGowan AP, Wise R. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48**: 17–28.

35. Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC *et al.* *In vitro* susceptibility of recent clinical isolates of pneumococci to the investigational cephalosporin cefditoren. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; **42**: 59–64.

36. Johnson DM, Biedenbach DJ, Beach ML *et al.* Antimicrobial activity and *in vitro* susceptibility test development for cefditoren against *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; **37**: 99–105.

37. Jones RN, Biedenbach DJ, Croco MA *et al.* *In vitro* evaluation of a novel orally administered cephalosporin (cefditoren) tested against 1249 recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; **31**: 573–8.

38. MacGowan AP, Noel AR, Rogers CA *et al.* Antibacterial effects of amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains for which MICs are high, in an *in vitro* pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2599–603.

Influence of TEM-1 β -Lactamase on the Pharmacodynamic Activity of Simulated Total versus Free-Drug Serum Concentrations of Cefditoren (400 Milligrams) versus Amoxicillin-Clavulanic Acid (2,000/125 Milligrams) against *Haemophilus influenzae* Strains Exhibiting an N526K Mutation in the *ftsI* Gene[▽]

M. Torrico,¹ L. Aguilar,¹ N. González,¹ M. J. Giménez,¹ O. Echeverría,¹ F. Cafini,¹
D. Sevillano,¹ L. Alou,¹ P. Coronel,² and J. Prieto^{1*}

Microbiology Department, School of Medicine, University Complutense, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain,¹ and
Scientific Department, Tedec-Meiji Farma SA, Ctra. M-300, Km. 30,500, 28802 Alcalá de Henares, Madrid, Spain²

Received 5 December 2006/Returned for modification 9 April 2007/Accepted 23 July 2007

The aim of this study was to explore bactericidal activity of total and free serum simulated concentrations after the oral administration of cefditoren (400 mg, twice daily [bid]) versus the oral administration of amoxicillin-clavulanic acid extended release formulation (2,000/125 mg bid) against *Haemophilus influenzae*. A computerized pharmacodynamic simulation was performed, and colony counts and β -lactamase activity were determined over 48 h. Three strains were used: ampicillin-susceptible, β -lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR) (also resistant to amoxicillin-clavulanic acid) and β -lactamase-positive amoxicillin-clavulanic acid-resistant (BLPACR) strains, with cefditoren MICs of ≤ 0.12 $\mu\text{g/ml}$ and amoxicillin-clavulanic acid MICs of 2, 8, and 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Against the ampicillin-susceptible and BLNAR strains, bactericidal activity (≥ 3 log₁₀ reduction) was obtained from 6 h on with either total and free cefditoren or amoxicillin-clavulanic acid. Against the BLPACR strain, free cefditoren showed bactericidal activity from 8 h on. In amoxicillin-clavulanic acid simulations the increase in colony counts from 4 h on occurred in parallel with the increase in β -lactamase activity for the BLPACR strain. Since both BLNAR and BLPACR strains exhibited the same MIC, this was due to the significantly lower ($P \leq 0.012$) amoxicillin concentrations from 4 h on in simulations with β -lactamase positive versus negative strains, thus decreasing the time above MIC ($T > \text{MIC}$). From a pharmacodynamic point of view, the theoretical amoxicillin $T > \text{MIC}$ against strains with elevated ampicillin/amoxicillin-clavulanic acid MICs should be considered with caution since the presence of β -lactamase inactivates the antibiotic, thus rendering inaccurate theoretical calculations. The experimental bactericidal activity of cefditoren is maintained over the dosing interval regardless of the presence of a mutation in the *ftsI* gene or β -lactamase production.

The introduction of the *Haemophilus influenzae* b vaccine has decreased the incidence in invasive disease, but *H. influenzae* remains a key respiratory pathogen in humans. Changes in *H. influenzae* ecology arise together with changes in resistance phenotypes: the β -lactamase production phenotype, which has been related to antibiotic consumption (14); the β -lactamase-negative ampicillin-resistant phenotype (BLNAR), which has appeared and become more prevalent worldwide in the last decade (15, 17, 32, 35); and the β -lactamase positive amoxicillin-clavulanic acid-resistant (BLPACR) phenotype, which is increasingly important in some parts of the world such as Japan (15). The latter two phenotypes are also increasingly important in Spain (11). Resistance to amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid in BLNAR and BLPACR strains is associated with mutations in the *ftsI* gene causing alterations in the amino acid sequences of PBP3 (25), with similar β -lactamase

types in BLPACR and classical ampicillin-resistant β -lactamase-positive isolates (25).

The dissemination and emergence of BLNAR and BLPACR phenotypes has led to questions about the therapeutic activity of old and new β -lactams. Clinical trials will probably not include enough number of patients with these strains, precluding correlations of these phenotypes with therapeutic activity. Experimental pharmacodynamic simulations mimicking physiological concentrations of antimicrobials can be used as alternative approaches to explore the bactericidal activity of different compounds against these types of isolates.

The aim of the present study was to explore the bactericidal activity of simulated serum concentrations of cefditoren versus amoxicillin-clavulanic acid against two *H. influenzae* strains exhibiting an N526K mutation in the *ftsI* gene (one BLNAR and one BLPACR) controlled with an ampicillin-susceptible strain. Free-drug concentrations have been considered microbiologically active in vitro (7). Since the antibiotics used in the present study exhibited different levels of protein binding, total and free serum concentrations were simulated to explore the theoretical influence of protein binding on the above-mentioned bactericidal activity, because there are some controver-

* Corresponding author. Mailing address: Microbiology Department, School of Medicine, University Complutense, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34 91 3941508. Fax: 34 91 3941511. E-mail: jprieto@med.ucm.es.

[▽] Published ahead of print on 30 July 2007.

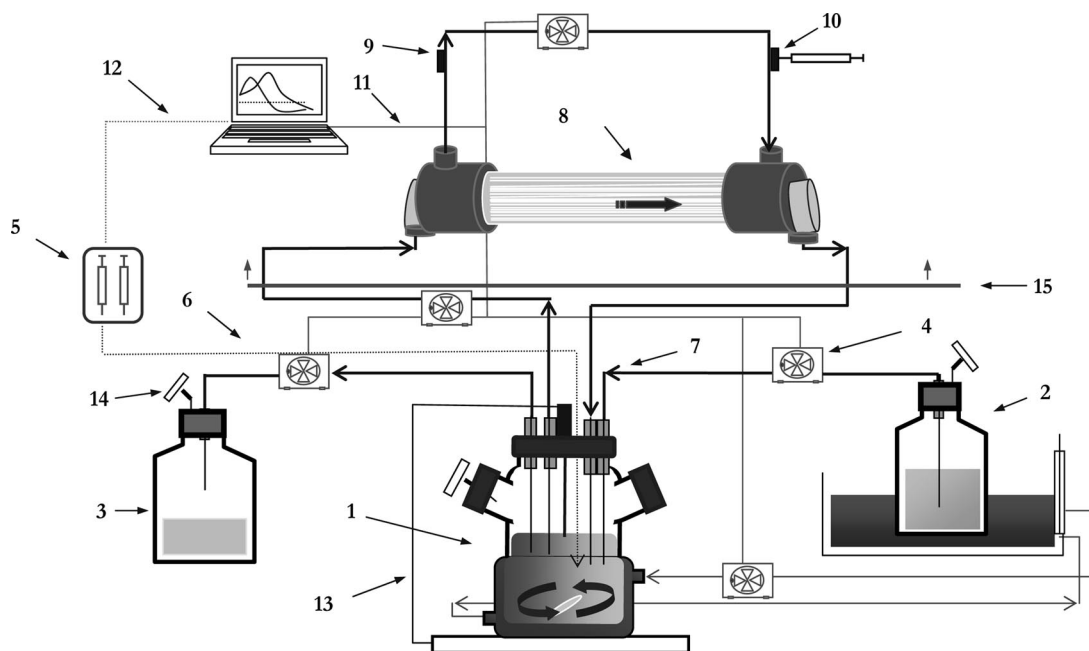


FIG. 1. Diagram of the in vitro computerized device. 1, Central compartment (spinner flask, tubing, and lumen of capillary); 2, fresh broth reservoir; 3, elimination; 4, peristaltic pumps; 5, syringe pump; 6, PTFE tubing; 7, silicone tubing; 8, infection compartment (extracapillary space); 9, inoculation port; 10, sample port; 11, RS-232 connection; 12, GSI OC connection; 13, temperature probe; 14, air filter; 15, incubator.

sial data on the influence of protein binding on antibacterial activity (4, 22, 34).

MATERIALS AND METHODS

Strains. Three *H. influenzae* isolates were used throughout the present study. Isolate 1 was ampicillin susceptible (no mutations in the *ftsI* gene and no β -lactamase TEM-1 producer), isolate 2 exhibited N526K mutation in the *ftsI* gene and was TEM-1 negative (BLNAR), and isolate 3 exhibited N526K mutation in the *ftsI* gene and was TEM-1 positive (BLPACR). Mutations in *ftsI* and TEM-1 genes were determined by PCR amplification and direct sequencing (8, 31).

Prior to and after the in vitro simulation process, the MICs of ceftidoren and amoxicillin-clavulanic acid were determined three times by the microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations (28). Modal values were considered.

In vitro kinetic model (Fig. 1). A previously described two-compartment dynamic model exposing bacteria to changing study drug concentrations and avoiding the dilution of the bacterial inoculum together with the drug was adapted to simulate antimicrobial combinations with different levels of clearance from the system (3, 33). The central compartment consists of a spinner flask, the lumina of the capillaries within the dialyzer (FX50 class; Fresenius Medical Care S.A., Barcelona, Spain), and the tubing in between. The infection site was represented by the extracapillary space of the dialyzer unit combined with the intradialyzer circulating tubing. The high surface area/volume ratio of the dialysis unit ($>200 \text{ cm}^2/\text{ml}$) yields a rapid equilibration of the concentration of the antimicrobial agent between the two compartments.

Before each experiment the central compartment was filled with medium Mueller-Hinton broth supplemented with $15 \mu\text{g}$ of NAD/ml, $15 \mu\text{g}$ of hemin/ml, and 5 mg/ml of yeast extract (*Haemophilus* test medium; Difco laboratories, Detroit, MI). The mono-exponential decay of ceftidoren or clavulanic acid concentrations in the central compartment was achieved by a continuous dilution-elimination process using computerized peristaltic pumps (Masterflex; Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL) at rates of 3.4 or 5.2 ml/min, respectively, to simulate their respective half-lives in human serum. Due to the sustained release of amoxicillin from the amoxicillin-clavulanic acid formulation, amoxicillin was supplemented at a rate of 3.6 ml/min to compensate for the excess of concentrations eliminated from the central compartment. Flow rates were adjusted to 4 ml/min to simulate the terminal phase of amoxicillin (from 6 h to 12 h) in the central compartment. Flow rates set in the peristaltic pumps were controlled by using Win Lin software v.2 (Masterflex).

Control drug-free simulations were performed by using a fixed rate in peristaltic pumps of 1 ml/min. Both compartments were maintained at 37°C during the simulation process.

Kinetic simulations. Free and total drug concentrations in serum of ceftidoren and amoxicillin-clavulanic acid, after an oral twice-daily (bid) regimen of 400 mg of ceftidoren-pivoxil (26, 27) and 2,000 and 125 mg of amoxicillin-clavulanic acid sustained-release formulation (19), were simulated over 48 h. Figure 2 shows target concentration-time curves. The target pharmacokinetic parameters of ceftidoren were as follows: $C_{\text{max}} = 4.20 \mu\text{g/ml}$ (total drug), $T_{\text{max}} = 2.75 \text{ h}$, and $t_{1/2} = 1.55 \text{ h}$ (26, 27). Assuming a protein binding of 88% (36), the target ceftidoren free C_{max} was $0.5 \mu\text{g/ml}$. The target parameters of amoxicillin-clavulanic acid were as follows: total $C_{\text{max}} = 17 \mu\text{g/ml}$, free $C_{\text{max}} = 13.9 \mu\text{g/ml}$ (protein binding of 18%), $T_{\text{max}} = 1.5 \text{ h}$, and $t_{1/2} = 1.3 \text{ h}$ for amoxicillin and total $C_{\text{max}} = 2 \mu\text{g/ml}$, free $C_{\text{max}} = 1.5 \mu\text{g/ml}$ (protein binding of 25%), $T_{\text{max}} = 1.5 \text{ h}$, and $t_{1/2} = 1 \text{ h}$ for clavulanic acid (19).

Measurement of antibacterial effect. Bacterial suspensions in *Haemophilus* test medium from an overnight culture in chocolate agar were allowed to grow to a density of 10^8 CFU/ml , as measured by a UV-spectrophotometer (Hitachi U-1100). A portion (60 ml) of this inoculum was introduced into the peripheral compartment. Samples (0.5 ml) from the peripheral compartment were collected at 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 34, 36, and 48 h and serially diluted in 0.9% of cold sodium chloride. At least four dilutions of each sample were spread onto chocolate agar, followed by incubation at 37°C , and colonies were counted after 24 h. The limit of detection was 50 CFU/ml. Each experiment was performed in triplicate.

Pharmacokinetic analysis. For the measurement of simulated antimicrobial concentrations, additional aliquots (0.5 ml) were drawn from the peripheral compartment at 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 34, 36, and 48 h and at the time corresponding to the target T_{max} of each antimicrobial in simulations with β -lactamase-positive and -negative strains. All samples were stored at -50°C until use. Concentrations were determined by bioassay using *Morganella morganii* ATCC 8076H as an indicator organism for ceftidoren (lineal concentrations from 0.03 to $4 \mu\text{g/ml}$; limit of detection = $0.015 \mu\text{g/ml}$), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 for amoxicillin, and *Klebsiella pneumoniae* NCTC 11228 for clavulanic acid concentrations (1). Standards and dilutions, if required, were prepared in the same broth used in the pharmacokinetic simulation and were added to wells in the plates with an even lawn of the indicator organism. Plates were incubated for 18 to 24 h at 37°C . The intraday and interday coefficients of variation were $<1\%$ for ceftidoren at a concentration of $0.75 \mu\text{g/ml}$,

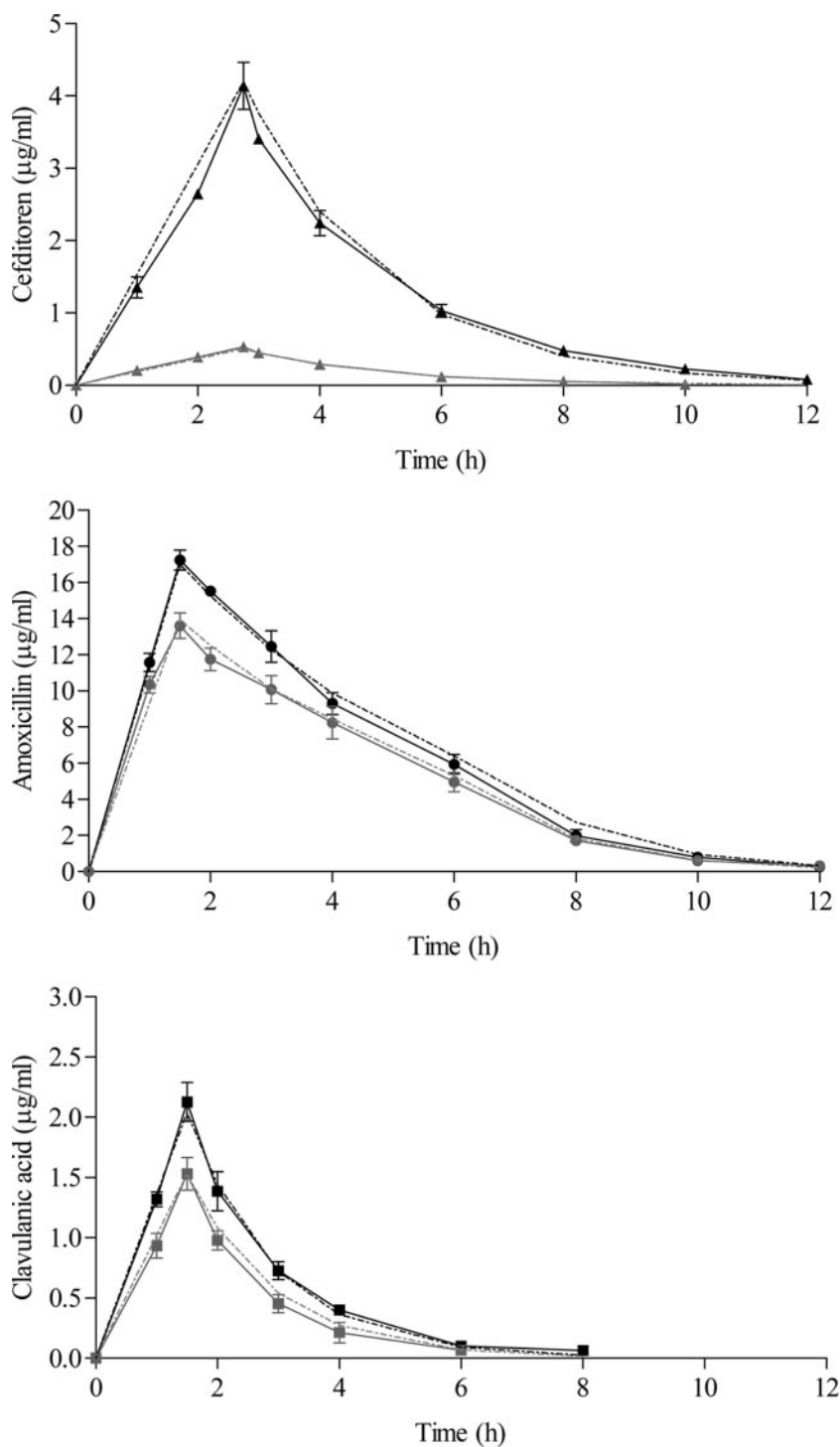


FIG. 2. Target (dotted lines) and experimental (solid lines) profiles in β -lactamase-negative simulations of total (black) and free (gray) concentrations in a 400-mg cefditoren dose simulation and 2,000 mg of amoxicillin and 125 mg of clavulanic acid from the sustained release simulation.

$\leq 3.2\%$ for amoxicillin at a concentration of $0.3 \mu\text{g/ml}$, and $< 2.6\%$ for clavulanic acid at a concentration of $0.75 \mu\text{g/ml}$.

Antimicrobial concentrations were analyzed by a noncompartmental approach (model 200) using WinNonlin professional program version 5.2 (Pharsight, Mountain View, CA). C_{max} and T_{max} values were obtained directly from the observed data. The area under the concentration-time curve from 0 to 24 h (AUC_{0-24}) was calculated by the linear-log trapezoidal rule.

Measurement of β -lactamase activity. β -Lactamase activity was measured at each sampling time for the BLPACR strain and at time zero and 24 h for the β -lactamase-nonproducing strains by using a modification of a previously described method (24, 30). In brief, 0.025 ml of a $500\text{-}\mu\text{g/ml}$ solution of nitrocefin was added to $225\text{-}\mu\text{l}$ portions of samples collected at sampling times for colony counting, followed by incubation for 30 min at 37°C . Afterward, 0.5 ml of 0.05 M phosphate buffer was added, and the absorbance at 486

TABLE 1. Experimentally obtained pharmacokinetic parameters in β -lactamase-negative simulations and T>MICs

Pharmacokinetic parameter	Cefditoren		Amoxicillin		Clavulanic acid	
	Total	Free	Total	Free	Total	Free
Mean C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	4.1 \pm 0.3	0.5 \pm 0.0	17.2 \pm 0.6	13.6 \pm 0.7	2.1 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1
Mean T_{\max} (h) \pm SD	2.8 \pm 0.0	2.8 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0
Mean $t_{1/2}$ (h) \pm SD	1.6 \pm 0.05	1.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
Mean AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$) \pm SD	14.8 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3	73.1 \pm 1.2	60.7 \pm 3.3	4.7 \pm 0.2	2.9 \pm 0.1
T>MIC index ^a						
Ampicillin susceptible	100	100	65.4	63.3		
BLNAR	99.3	44.1	34.6	28.3		
BLPACR	100	62.5	34.6	28.3		

^a Expressed as the percent dosing interval. The value was determined on an amoxicillin basis in the case of the amoxicillin-clavulanic MIC.

nm (A_{486}) was spectrophotometrically read, using broth without inoculum as the baseline absorbance.

Statistical analysis. Differences in \log_{10} colony counts at each sampling time with respect to initial inocula were calculated. Differences in \log_{10} reductions between antibiotics at dosing times (12, 24, 36, and 48 h) and at 6 h for each strain were determined by the Student *t* test. Since experiments were performed in triplicate, $P \leq 0.012$ was considered statistically significant after alpha-adjustment.

RESULTS

The pre- and postsimulation MICs ($\mu\text{g/ml}$) were identical for cefditoren and amoxicillin-clavulanic acid: 0.015 and 2 for the ampicillin-susceptible strain, 0.12 and 8 for the BLNAR strain, and 0.06 and 8 for the BLPACR strain, respectively.

Figure 2 shows experimental concentration-time curves determined in simulations with β -lactamase-negative strains. Similar experimental versus target concentrations were obtained. Table 1 shows the pharmacokinetic parameters experimentally obtained in β -lactamase-negative simulations and time above MIC (T>MIC) values. The experimental pharmacokinetic parameter values were similar to the target values described above in Materials and Methods.

Figure 3 shows the colony counts over time in antibiotic-free simulations and those carried out with total and free concentrations of both study drugs.

Table 2 shows initial inoculum reduction (\log_{10} colony counts at time zero – \log_{10} colony counts at each sampling time) in simulations with total and free cefditoren and amoxicillin-clavulanic acid concentrations against the three study strains.

Against the ampicillin-susceptible strain, a bactericidal activity ($\geq 3 \log_{10}$ reduction) was obtained from 6 h onward with either total or free cefditoren or amoxicillin-clavulanic acid. However, significantly higher initial inocula reductions were obtained with total and free cefditoren ($>6.3 \log_{10}$) at 12, 24, 36, and 48 h ($P < 0.001$).

Against the BLNAR strain, bactericidal activity ($\geq 3 \log_{10}$ reduction) was obtained from 6 h on with both study drugs in total and free simulations. Significantly ($P < 0.001$) higher bactericidal activity was observed with cefditoren total drug—but not with free drug—at 24, 36, and 48 h.

Against the BLPACR strain, free cefditoren showed bactericidal activity from 8 h on. This activity was significantly ($P < 0.001$) better than free amoxicillin-clavulanic acid, which achieved only small reductions of $<2 \log_{10}$.

When exploring activity at 6 h (early bactericidal activity;

50% of the first dosing interval), no significant differences were found between free cefditoren and amoxicillin-clavulanic acid against the ampicillin-susceptible strain ($P = 0.02$) and the BLNAR isolate ($P = 0.14$), but differences were significant against the BLPACR strain ($P = 0.011$), favoring cefditoren.

No β -lactamase activity was observed for the ampicillin-susceptible and the BLNAR strains both at 0 h and at 24 h. Figure 4 shows the β -lactamase activity (absorbance units) of the BLPACR strain in antibiotic-free simulations and in simulations with total and free concentrations of study drugs. The β -lactamase activity in antibiotic-free simulations was >0.4 from 3 h on. The β -lactamase activity in cefditoren simulations decreased to nondetectable values from 12 h on in total drug simulations and from 27 h on in free-drug simulations. The β -lactamase activity in total and free amoxicillin-clavulanic acid simulations decreased within the first 4 h after dosing but increased to values of 0.4 absorbance units at 12, 24, 36, and 48 h, values similar to those measured in antibiotic-free simulations. Colony counts for the BLPACR strain (Fig. 3) in amoxicillin-clavulanic acid simulations increased in parallel with the increase in β -lactamase activity from 4 h on (Fig. 4).

The increase in colony counts for the BLPACR strain but not with the BLNAR strain, both exhibiting the same experimental T>MIC (when calculated with concentrations determined in simulations with β -lactamase-negative strains; Table 1), was due to the significantly lower ($P \leq 0.012$) amoxicillin concentrations from 4 h on in total drug or 2 h on in free drug simulations when we compared simulations with the β -lactamase-positive versus β -lactamase-negative strains (Table 3).

The presence of β -lactamase activity led to significantly lower amoxicillin AUC₀₋₂₄ in simulations with β -lactamase-positive versus β -lactamase-negative strains (Table 3) and a pronounced decrease in T>MIC (from 34.6 to 23.3% in total simulations and from 28.3 to 10.4% in free simulations) for the BLPACR strain. No differences were found in cefditoren concentrations over time measured in simulations with β -lactamase-positive versus β -lactamase-negative strains.

DISCUSSION

In Spain, while β -lactamase production in *H. influenzae* was found at a constant frequency of ca. 20 to 25% in successive nationwide surveillance studies (SAUCE Program) carried out in 1996 to 1997 (13), 1998 and 1999 (23), and 2001 and 2002 (29), the BLNAR phenotype prevalences were 9 and 4.5% in

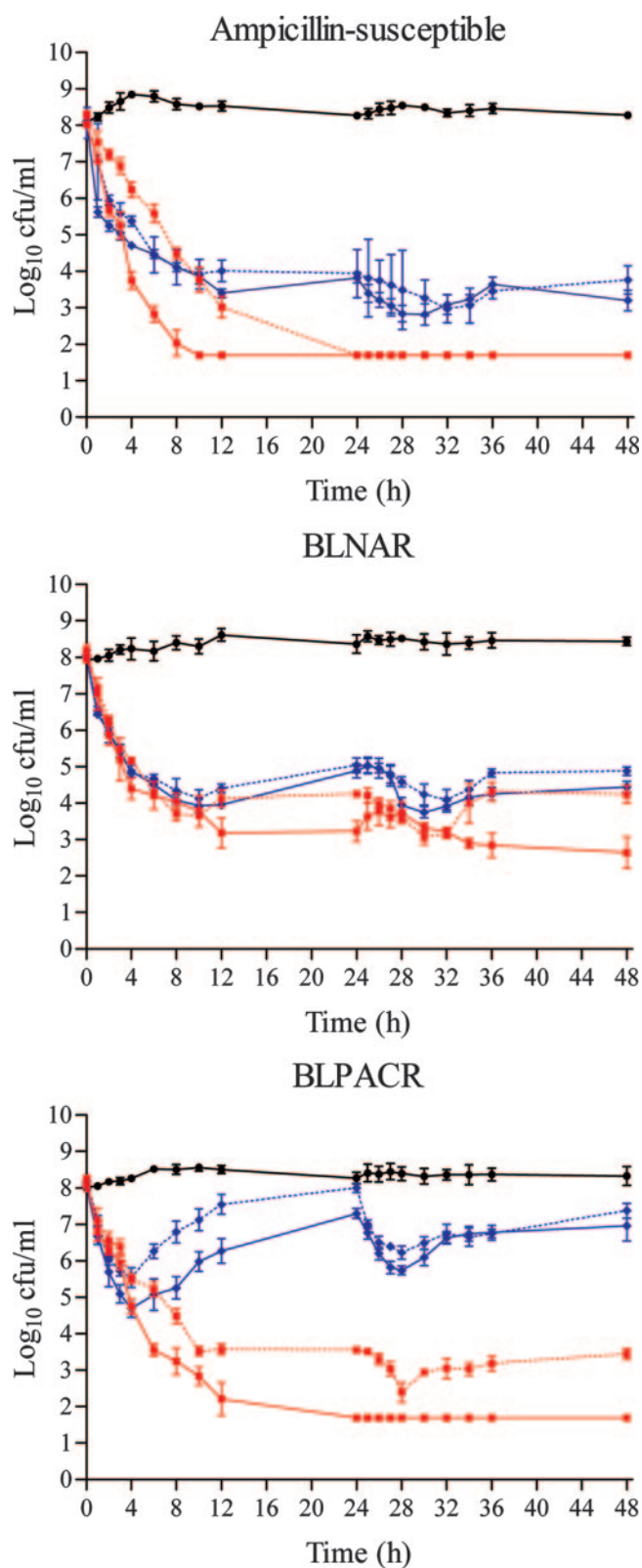


FIG. 3. Colony counts over 48 h in antibiotic-free simulations (black), simulations with total cefditoren (red solid line), free cefditoren (red dotted line), total amoxicillin-clavulanic acid (blue solid line), and free amoxicillin-clavulanic acid (blue dotted line). The regimens simulated were cefditoren (400 mg bid) and amoxicillin-clavulanic acid (2,000/125 mg bid) sustained release.

the 1998-1999 and 2001-2002 surveillance studies, respectively, and the BLPACR phenotype was not detected in the first surveillance study and was anecdotal (0.1%) in the other two. Similar BLNAR rates have been reported in United States (16) and Europe (18), with this last report suggesting the highest rates in Spain (up to ca. 30%). In Japan isolation rates as high as ca. 40% have been reported (32).

The increase and/or appearance of these new BLNAR and BLPACR phenotypes raises the question of the clinical activity of old and new β -lactams. The resistance of BLNAR and BLPACR phenotypes to previous antibiotics such as amoxicillin with or without clavulanic acid is due to changes in PBP3 (25). In the BLPACR phenotype, in addition to this resistance mechanism, β -lactamase production is present, and the β -lactamase type is primary TEM-1 (25). These phenotypes should also be considered resistant to previous cephalosporins such as cefaclor, cefamandole, cefetamet, cefuroxime, cefonicid, cefprozil, cefpodoxime, or cefdinir (5).

The evaluation of old and new β -lactams should be based on the study of their pharmacodynamic activity. The presence of mutations in the *ftsI* gene in the BLNAR phenotype and the additional TEM-1 β -lactamase production in the BLPACR phenotype may influence the values of the pharmacokinetic/pharmacodynamic index predicting bactericidal activity, by increasing the MIC and by reducing target site concentrations due to enzymatic degradation by β -lactamases. The $T > \text{MIC}$ has been considered the pharmacokinetic/pharmacodynamic index predicting efficacy for β -lactams. Values of ca. 40% of the dosage interval for penicillins and of ca. 50% for cephalosporins have been related to bacterial eradication and subsequent therapeutic efficacy in animal models and human infections (2, 6, 9). In the present study we used a computerized device to explore the bactericidal activity over the dosing interval of simulated serum concentrations obtained after the oral administration of amoxicillin-clavulanic acid (2,000/125 mg) or cefditoren (400 mg) against an ampicillin-susceptible, a BLNAR, and a BLPACR strain. Free drug was tested because the unbound form of an antimicrobial is the active form in vitro and presumably in vivo (7), but since there are some controversial data on the influence of protein binding on the antibacterial activity both in vivo (22) and in vitro (4, 34), experiments were also carried out with total drug to explore the potential maximal and minimal activities (i.e., the range containing the actual activity).

Against the ampicillin-susceptible strain, free cefditoren showed significantly higher bactericidal activity after the second dose than did amoxicillin-clavulanic acid. The $T > \text{MIC}$ was $>50\%$ for both drugs. This high bactericidal activity of cefditoren is maintained against the two strains harboring the N526K mutation in the *ftsI* gene (free cefditoren $T > \text{MIC}$ of $>40\%$). Surprisingly, in the case of amoxicillin-clavulanic acid the activity of total and free drug against the BLNAR strain was high, with bactericidal activity ($>3 \log_{10}$ reduction) from 6 h onward despite its high MIC (8 $\mu\text{g/ml}$), a value considered resistant. Total and free amoxicillin $T > \text{MIC}$ values were 34.6 and 28.3% of the dosing interval, respectively; values lower than those classically considered for bactericidal activity with penicillins. However, the production of TEM-1 β -lactamase as an additional resistance mechanism in the BLPACR strain rendered amoxicillin-clavulanic acid nonbactericidal regardless

TABLE 2. Log₁₀ reductions in simulations with total and free cefditoren and amoxicillin-clavulanic acid concentrations

Phenotype and antibiotic(s) ^a	Mean log ₁₀ reductions (log ₁₀ colony counts at time zero – log ₁₀ colony counts) ± SD at each sampling time							
	6 h	8 h	12 h	24 h	28 h	30 h	36 h	48 h
Ampicillin susceptible								
Total CDN	5.2 ± 0.3	6.0 ± 0.4	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Total AMC	3.6 ± 0.1	4.0 ± 0.0	4.7 ± 0.2	4.3 ± 0.1	5.3 ± 0.2	5.3 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.9 ± 0.2
Free CDN	2.7 ± 0.2	3.8 ± 0.1	5.3 ± 0.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Free AMC	3.6 ± 0.4	4.0 ± 0.3	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.6 ± 0.3	4.8 ± 0.0	4.6 ± 0.2	4.3 ± 0.2
BLNAR								
Total CDN	4.0 ± 0.5	4.2 ± 0.4	5.0 ± 0.5	5.0 ± 0.4	4.5 ± 0.5	4.9 ± 0.1	5.3 ± 0.5	5.5 ± 0.6
Total AMC	3.5 ± 0.2	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.1	3.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.1
Free CDN	3.7 ± 0.1	4.3 ± 0.3	3.8 ± 0.2	3.7 ± 0.0	4.3 ± 0.2	4.9 ± 0.3	3.6 ± 0.3	3.7 ± 0.3
Free AMC	3.4 ± 0.3	3.7 ± 0.5	3.7 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.5 ± 0.3	3.8 ± 0.4	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.3
BLPACR								
Total CDN	4.7 ± 0.2	5.0 ± 0.3	6.0 ± 0.5	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Total AMC	2.9 ± 0.5	2.8 ± 0.4	1.8 ± 0.5	0.8 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.5
Free CDN	2.9 ± 0.3	3.6 ± 0.0	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.2	5.7 ± 0.4	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.4	4.6 ± 0.1
Free AMC	1.9 ± 0.3	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.1 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.0	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.4

^a CDN, cefditoren; AMC, amoxicillin-clavulanic acid.

of the same MIC (8 µg/ml) for this strain and the BLNAR strain. The reason for this lack of bactericidal activity against the BLPACR strain was that clavulanic acid concentrations were <0.5 µg/ml from 4 h on, with nondetectable values from 8 h on. From 4 h on, the β-lactamase activity of the BLPACR strain began to increase, reaching values similar to those in antibiotic-free simulations from 8 to 12 h. β-Lactamase activity inactivated amoxicillin, producing lower amoxicillin concentrations in simulations with the BLPACR strain. The experimental free/total ratios were very similar over time (range, 0.8 to 0.9) in β-lactamase negative simulations (Table 3). These free/total ratios do not have the same values in β-lactamase-positive simulations (ranging from 0.9 at 1 h to 0.01 at 6 h) due to the influence of the β-lactamase inactivation of amoxicillin. Although the value is equal at 1 h, differences increase over time, resulting in a high difference at 6 h (0.8 versus 0.01). This is due to the β-lactamase action, which logically affects low concentrations (free profile) more than high concentrations (total profile). Due to this, the experimentally measured T>MIC decreased from 34.6% (in β-lactamase negative simulations) to

23% in BLPACR simulations of total concentrations and from 28.3 to 10.4% for free concentrations.

Since both BLNAR and BLPACR strains had the same MIC, calculation of T>MIC using concentrations from phase I trials results in information far from the actual situation because it does not consider the influence of β-lactamase activity, when present, on the T>MIC. This suggests that bid regimens of clavulanic acid may be inadequate against *H. influenzae* strains exhibiting elevated amoxicillin-clavulanic acid MICs. In a previous study (21) using similar methodology, brief exposure to clavulanic acid seemed not to have affected the bactericidal activity of amoxicillin concentrations (corresponding also to those obtained after the 2,000/125-mg sustained release formulation) against β-lactamase-positive strains. Differences between both studies are due to the lower MICs values of amoxicillin-clavulanic acid for the strains used (0.5 to 0.75 µg/ml) in the previous study; thus, isolates probably did not present mutation in the *ftsI* gene (12) and were not BLPACR.

It may be argued that, in vivo, the decrease in average

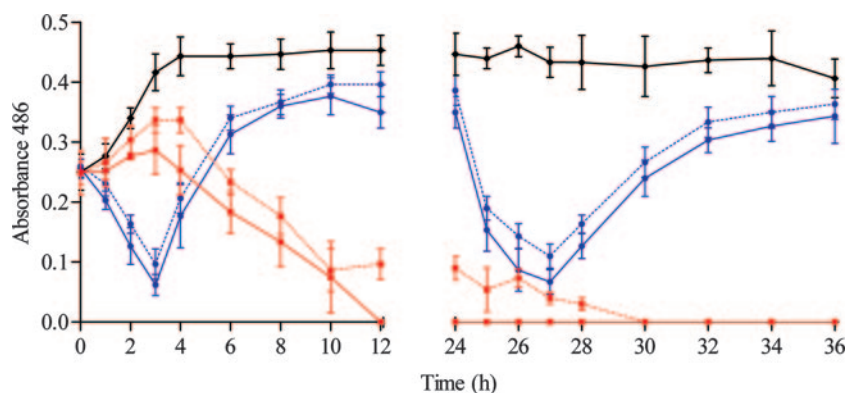


FIG. 4. β-Lactamase activity (absorbance units) of the BLPACR in simulations with total cefditoren (red line), free cefditoren (dotted red line), total amoxicillin-clavulanic acid (blue line), and free amoxicillin-clavulanic acid (dotted blue line) versus antibiotic-free simulations (black line).

TABLE 3. Amoxicillin concentrations, pharmacokinetic parameters, and T>MICs in β-lactamase-positive versus β-lactamase-negative simulations^a

Pharmacokinetic parameter	Amoxicillin				Clavulanic acid			
	Total		Free		Total		Free	
	β pos	β neg	β pos	β neg	β pos	β neg	β pos	β neg
Mean Conc (μg/ml) ± SD at time (h)								
1	11.6 ± 0.6	11.6 ± 0.5	9.9 ± 2.2	10.4 ± 0.5	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
1.5	17.4 ± 0.8	17.2 ± 0.6	13.3 ± 0.9	13.6 ± 0.7	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.1
2	14.1 ± 0.5	15.5 ± 0.2	7.8 ± 0.9*	11.8 ± 0.6	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
3	10.5 ± 0.1	12.5 ± 0.9	2.9 ± 0.0*	10.1 ± 0.8	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.1
4	5.5 ± 0.7*	9.3 ± 0.6	0.8 ± 0.2*	8.2 ± 0.9	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1
6	2.1 ± 0.2*	5.9 ± 0.5	<0.03	5.0 ± 0.5	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
8	<0.03	2.0 ± 0.3	<0.03	1.7 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	<0.03	<0.03
10	<0.03	0.8 ± 0.0	<0.03	0.6 ± 0.2	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
12	<0.03	0.3 ± 0.1	<0.03	0.3 ± 0.1	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
Mean C _{max} (μg/ml) ± SD	17.4 ± 0.6	17.2 ± 0.6	13.3 ± 0.9	13.6 ± 0.7	2.1 ± 0.0	2.1 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1
Mean AUC ₀₋₂₄ (μg/ml · h) ± SD	48.7 ± 0.2*	73.1 ± 1.2	22.5 ± 2.4*	60.7 ± 3.3	4.5 ± 0.0	4.7 ± 0.0	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.1
Mean T>MIC (% dosing interval) ^b	23.3	34.6	10.4	28.3				

^a β pos, β-lactamase-positive simulations; β neg, β-lactamase-negative simulations. *, $P \leq 0.012$ versus β-negative simulations.

^b For the BLPACR strain.

amoxicillin concentrations might be less pronounced than the decrease in in vitro systems, although previous in vivo experiments have shown lower ampicillin concentrations when the infection was caused by β-lactamase-positive versus β-lactamase-negative strains (20).

The results of this experimental study point out that, from the pharmacodynamic point of view, the theoretical amoxicillin T>MIC (calculated using pharmacokinetic data from phase I studies) against β-lactamase-positive strains with elevated ampicillin–amoxicillin–clavulanic acid MICs should be viewed with caution since the presence of TEM-1 β-lactamase inactivates the antibiotic, thus rendering inaccurate theoretical calculations. The experimental bactericidal activity of cefditoren is maintained over the dosing interval regardless of the presence of mutation in the *ftsI* gene or β-lactamase production. Although cefditoren exhibits high protein binding, free concentrations were enough to be active against *H. influenzae* that, as in the present study, exhibit low cefditoren MICs regardless of the resistance phenotype (10, 12).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by an unrestricted grant from Tedec-Mejji Farma SA, Madrid, Spain.

We thank M. Gimeno for critical review of the manuscript and J. García-de-Lomas (Instituto Valenciano de Microbiología) for providing the *ftsI* gene sequenced strains.

REFERENCES

- Andrews, J. M. 1999. Microbiological assays, p. 35–44. In D. S. Reeves, R. Wise, J. M. Andrews, and L. O. White (ed.), *Clinical antimicrobial assays*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Ball, P., F. Baquero, O. Cars, T. File, J. Garau, K. Klugman, D. E. Low, E. Rubinstein, R. Wise, et al. 2002. Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:31–40.
- Blaser, J. 1985. In-vitro model for simultaneous simulation of the serum kinetics of two drugs with different half-lives. *J. Antimicrob. Chemother.* **15**(Suppl. A):125–130.
- Cafini, F., L. Aguilar, N. Gonzalez, M. J. Gimenez, M. Torrico, L. Alou, D. Sevillano, P. Vallejo, and J. Prieto. 2007. In vitro effect of the presence of human albumin or human serum on the bactericidal activity of daptomycin against strains with the main resistance phenotypes in gram-positives. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:1185–1189.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100–S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Craig, W. A. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1–10.
- Craig, W. A., and C. M. Kunin. 1976. Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents. *Annu. Rev. Med.* **27**:287–300.
- Dabernat, H., C. Delmas, M. Seguy, R. Pelissier, G. Faucon, S. Bennamani, and C. Pasquier. 2002. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2208–2218.
- Dagan, R., K. P. Klugman, W. A. Craig, and F. Baquero. 2001. Evidence to support the rationale that bacterial eradication in respiratory tract infection is an important aim of antimicrobial therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:129–140.
- Fenoll, A., L. Aguilar, O. Robledo, M. J. Gimenez, D. Tarrago, J. J. Granizo, M. Gimeno, and P. Coronel. 2007. Influence of the β-lactam resistance phenotype on the cefuroxime versus cefditoren susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* recovered from children with acute otitis media. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:323–327.
- García-Cobos, S., J. Campos, E. Lázaro, F. Román, E. Cercenado, C. García-Rey, M. Pérez-Vázquez, J. Oteo, and F. de Abajo. 2007. Ampicillin-resistant non-β-lactamase producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2564–2573.
- García-de-Lomas, J., M. Lerma, L. Cebrian, J. L. Juan-Banon, P. Coronel, M. J. Gimenez, and L. Aguilar. 2007. Influence of *Haemophilus influenzae* beta-lactamase production and/or *ftsI* gene mutations on in vitro activity of and susceptibility rates to aminopenicillins and second- and third-generation cephalosporins. *Int. J. Antimicrob. Agents* **30**:190–192.
- García-Rodríguez, J. A., F. Baquero, J. García de Lomas, L. Aguilar, et al. 1999. Antimicrobial susceptibility of 1,422 *Haemophilus influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain: the results of a 1-year (1996–97) multicenter surveillance study. *Infection* **27**:265–267.
- Gómez, J., J. Ruiz-Gómez, J. L. Hernández-Cardona, M. L. Nuñez, M. Canteras, and M. Valdés. 1994. Antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*: a prospective study in Murcia, Spain, 1983–1992. *Chemotherapy* **40**:299–303.
- Hasegawa, K., N. Chiba, R. Kobayashi, S. Y. Murayama, S. Iwata, K. Sunakawa, and K. Ubukata. 2004. Rapidly increasing prevalence of beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1509–1514.
- Hasegawa, K., K. Yamamoto, N. Chiba, R. Kobayashi, K. Nagai, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, K. Sunakawa, and K. Ubukata. 2003. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb. Drug Resist.* **9**:39–46.
- Jacobs, M. R., S. Bajaksouzian, A. Zilles, G. Lin, G. A. Pankuch, and P. C. Appelbaum. 1999. Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacody-

- nam parameters: 1997 U.S. surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1901–1908.
18. Jansen, W. T., A. Verel, M. Beitsma, J. Verhoef, and D. Milatovic. 2006. Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:873–877.
 19. Kaye, C. M., A. Allen, S. Perry, M. McDonagh, M. Davy, K. Storm, N. Bird, and O. Dewit. 2001. The clinical pharmacokinetics of a new pharmacokinetically enhanced formulation of amoxicillin/clavulanate. *Clin. Ther.* **23**: 578–584.
 20. Lavoie, G. Y., and M. G. Bergeron. 1985. Influence of four modes of administration on penetration of aztreonam, cefuroxime, and ampicillin into interstitial fluid and fibrin clots and on in vivo efficacy against *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:404–412.
 21. Lowdin, E., O. Cars, and I. Odenholt. 2002. Pharmacodynamics of amoxicillin/clavulanic acid against *Haemophilus influenzae* in an in vitro kinetic model: a comparison of different dosage regimens including a pharmacokinetically enhanced formulation. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**:646–653.
 22. Moellering, R. C., and G. M. Eliopoulos. 2005. Principles of anti-infective therapy, p. 242–253. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett principles and practice of infectious diseases*, 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.
 23. Marco, F., J. Garcia-de-Lomas, C. Garcia-Rey, E. Bouza, L. Aguilar, C. Fernandez-Mazarrasa, et al. 2001. Antimicrobial susceptibilities of 1,730 *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Spain in 1998–1999. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3226–3228.
 24. Martin, M., L. Aguilar, I. P. Balcabao, M. L. Gomez-Lus, R. Dal-Re, and J. Prieto. 1997. In-vitro pharmacodynamic simulation of clavulanic acid concentrations: effect on *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* beta-lactamase activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:290–292.
 25. Matic, V., B. Bozdogan, M. R. Jacobs, K. Ubukata, and P. C. Appelbaum. 2003. Contribution of beta-lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanic acid resistance in beta-lactamase-positive, amoxicillin/clavulanic acid-resistant *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:1018–1021.
 26. Mulford, D., M. Mayer, and G. Witt. 2000. Effect of age and gender on the pharmacokinetics of cefditoren. Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 2000, abstr. 310. American Society for Microbiology, Washington, DC.
 27. Mulford, D., M. Mayer, and G. Witt. 2000. Effect of renal impairment on the pharmacokinetic of cefditoren. Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 2000, abstr. 311. American Society for Microbiology, Washington, DC.
 28. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 6th ed. NCCLS M7–A6. NCCLS, Wayne, PA.
 29. Perez-Trallero, E., C. Garcia-de-la-Fuente, C. Garcia-Rey, F. Baquero, L. Aguilar, R. Dal-Re, J. Garcia-de-Lomas, et al. 2005. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1965–1972.
 30. Prieto, J., L. Aguilar, M. J. Gimenez, D. Toro, M. L. Gomez-Lus, R. Dal-Re, and I. P. Balcabao. 1998. In vitro activities of co-amoxiclav at concentrations achieved in human serum against the resistant subpopulation of heteroresistant *Staphylococcus aureus*: a controlled study with vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1574–1577.
 31. Scriver, S. R., S. L. Walmsley, C. L. Kau, D. J. Hoban, J. Brunton, A. McGeer, T. C. Moore, and E. Witwicki. 1994. Determination of susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1678–1680.
 32. Seki, H., Y. Kasahara, K. Ohta, Y. Saikawa, R. Sumita, A. Yachie, S. Fujita, and S. Koizumi. 1999. Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan. *Chemotherapy* **45**:15–21.
 33. Sevillano, D., A. Calvo, M. J. Gimenez, L. Alou, L. Aguilar, E. Valero, A. Carcas, and J. Prieto. 2004. Bactericidal activity of amoxicillin against non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacodynamic model simulating the concentrations obtained with the 2000/125 mg sustained-release co-amoxiclav formulation. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:1148–1151.
 34. Sevillano, D., M. J. Gimenez, L. Alou, L. Aguilar, F. Cafini, M. Torrico, N. González, O. Echeverría, P. Coronel, and J. Prieto. Effects of human albumin and serum on the in vitro bactericidal activity of cefditoren against penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, in press.
 35. Ubukata, K., Y. Shibasaki, K. Yamamoto, N. Chiba, K. Hasegawa, Y. Takeuchi, K. Sunakawa, M. Inoue, and M. Konno. 2001. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1693–1699.
 36. Wellington, K., and M. P. Curran. 2004. Cefditoren pivoxil: a review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs* **64**:2597–2618.

β-Lactam Effects on Mixed Cultures of Common Respiratory Isolates as an Approach to Treatment Effects on Nasopharyngeal Bacterial Population Dynamics

David Sevillano¹, Lorenzo Aguilar^{1*}, Luis Alou¹, María-José Giménez¹, Natalia González¹, Martha Torrico¹, Fabio Cafini¹, Pilar Coronel², José Prieto¹

1 Microbiology Department., School of Medicine, University Complutense, Madrid, Spain, **2** Scientific Department, Tedec-Meiji Farma S. A., Madrid, Spain

Abstract

Background: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* are bacteria present in the nasopharynx as part of normal flora. The ecological equilibrium in the nasopharynx can be disrupted by the presence of antibiotics.

Methodology/Principal Findings: A computerized two-compartment pharmacodynamic model was used to explore β-lactam effects on the evolution over time of a bacterial load containing common pharyngeal isolates by simulating free serum concentrations obtained with amoxicillin (AMX) 875 mg tid, amoxicillin/clavulanic acid (AMC) 875/125 mg tid and cefditoren (CDN) 400 mg bid regimens over 24 h. Strains and MICs (μg/ml) of AMX, AMC and CDN were: *S. pyogenes* (0.03, 0.03 and 0.015), *S. pneumoniae* (2, 2 and 0.25), a β-lactamase positive *H. influenzae* (BL⁺; >16, 2 and 0.06) and a β-lactamase positive AMC-resistant *H. influenzae* (BLPACR, >16, 8 and 0.06). Mixture of identical 1:1:1 volumes of each bacterial suspension were prepared yielding an inocula of $\approx 4 \times 10^6$ cfu/ml. Antibiotic concentrations were measured both in bacterial and in bacteria-free antibiotic simulations. β-lactamase production decreased AMX concentrations and $fT_{>MIC}$ against *S. pneumoniae* (from 43.2% to 17.7%) or *S. pyogenes* (from 99.9% to 24.9%), and eradication was precluded. The presence of clavulanic acid countered this effect of co-pathogenicity, and *S. pyogenes* (but not BL⁺ and *S. pneumoniae*) was eradicated. Resistance of CDN to TEM β-lactamase avoided this co-pathogenicity effect, and CDN eradicated *S. pyogenes* and *H. influenzae* strains ($fT_{>MIC} > 58\%$), and reduced in 94% *S. pneumoniae* counts ($fT_{>MIC} \approx 25\%$).

Conclusions/Significance: Co-pathogenicity seems to be gradual since clavulanic acid countered this effect for strains very susceptible to AMX as *S. pyogenes* but not for strains with AMX MIC values in the limit of susceptibility as *S. pneumoniae*. There is a potential therapeutic advantage for β-lactamase resistant cephalosporins with high activity against streptococci.

Citation: Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez M-J, González N, et al. (2008) β-Lactam Effects on Mixed Cultures of Common Respiratory Isolates as an Approach to Treatment Effects on Nasopharyngeal Bacterial Population Dynamics. PLoS ONE 3(12): e3846. doi:10.1371/journal.pone.0003846

Editor: Keertan Dheda, University College London, United Kingdom

Received: August 22, 2008; **Accepted:** November 10, 2008; **Published:** December 4, 2008

Copyright: © 2008 Sevillano et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported in part by an unrestricted grant from Tedec-Meiji Farma S.A., Madrid, Spain. The sponsor had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: P. Coronel is an employee of Tedec-Meiji Farma SA

* E-mail: laguilar@med.ucm.es

Introduction

Carriage of common respiratory isolates as *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* depends on multiple factors such as active or passive smoking, crowding or age [1], strain fitness properties [2], specific vaccination [3], and bacterial interference in antibiotic-free niches. *H. influenzae* and *S. pneumoniae* are recovered exclusively from humans and find their ecological niche in colonizing nasopharynx. Up to 80% of healthy persons carry *H. influenzae* [4], with multiple strains in 50% positive samples [5]. In the case of *S. pneumoniae*, carriage ranges from 10% to 40% in an age dependent manner [6], with a lower percentage of multiple strains in the same sample [7]. While higher turnover of strains is found in *H. influenzae* [2], duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant streptococci (PRSP) depends on age, seasonality, carriage of PRSP by other family members [8], and serotype, with higher transmission for 6A and 14 [9]. The carriage

of strains resistant to β-lactams is a source of concern in some countries as Spain where penicillin non-susceptibility in *S. pneumoniae* reaches 44% isolates in the community [10], and ampicillin resistance in *H. influenzae* attains 25%, with 80% of these isolates being resistant due to β-lactamase production and 20% due to the BLNAR (β-lactamase negative ampicillin-resistant) phenotype [10] caused by mutations in the *ftsI* gene [11]. Strains exhibiting both resistant genotypes (TEM- β-lactamase and mutation in the *ftsI* gene) constitute the BLPACR (β-lactamase positive amoxicillin/clavulanate-resistant) phenotype and have been recently reported as cause of concern [11].

No problems of resistance to β-lactams are found in *S. pyogenes*, an ubiquitous microorganism that frequently colonizes throats of asymptomatic persons, with carriage rates of 15–20% in infants [12,13] and of 10% in adult smokers [1].

Mucosal surfaces may be simultaneously colonized by multiple species, and there is an intricate balance in the oropharynx

between *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and other oropharyngeal flora [14]. It has been suggested that this oropharyngeal flora is altered in *S. pyogenes* carriers with a decrease in other streptococcal species (alpha-hemolytic streptococci) with interfering capabilities [14,15]. On the other side the success of an organism in colonizing, and maybe in establishing a subsequent infection, might be determined by its ability to compete with co-habitants of its niche, since replication/survival of biological organisms serves to gain space and time [16], and to gain space is dominance (versus other populations) and to gain time is success [16]. Dynamics of different bacterial populations in antibiotic-free niches are the baseline that antibiotic treatments can alter [17,18].

In this study we explored the effect of physiological concentrations of three β-lactams (amoxicillin, amoxicillin plus a β-lactamase inhibitor, and a third generation oral cephalosporin resistant to TEM β-lactamases) on the evolution over time of a bacterial load containing a beta-hemolytic streptococci (*S. pyogenes*), an alpha-hemolytic streptococci (a serotype 14 penicillin-resistant *S. pneumoniae*), and two β-lactamase positive *H. influenzae* strains (one characterized as BLPACR) in the same niche.

Materials and Methods

Strains

Four clinical isolates were used throughout the study: one *S. pyogenes*, one serotype 14 penicillin-resistant *S. pneumoniae*, one β-lactamase TEM-1 producing *H. influenzae* (BL⁺), and one *H. influenzae* TEM-1 positive strain presenting a N526K mutation in the *ftsI* gene (BLPACR). BL⁺ was trimethoprim resistant (MIC >128 µg/ml) and the BLPACR strain was trimethoprim susceptible (0.12 µg/ml); this difference was used throughout the study to differentiate both strains. Mutations in the *ftsI* and TEM-1 genes were determined by PCR amplification and direct sequencing [19,20].

Culture media and preliminary studies

Different broth media were used in preliminary studies to determine which media showed the best growth rate over 24 h for all strains: a) Mueller-Hinton broth (Difco laboratories, Detroit, Mich.) supplemented with 5% lysed sheep blood (Biomedics, Madrid, Spain) (MHB) (as media recommended for streptococci) [21], b) Mueller-Hinton broth supplemented with 15 µg/ml nicotinamide adenine dinucleotide, 15 µg/ml haemin (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA), and 5 µg/ml of yeast extract (Difco laboratories) (HTM) (as media recommended for *H. influenzae*) [21], c) Todd-Hewitt broth supplemented with 5 µg/ml of yeast extract, and d) Todd-Hewitt broth (Difco laboratories) supplemented with 15 µg/ml nicotinamide adenine dinucleotide, 15 µg/ml haemin and 5 µg/ml of yeast extract (THSB). THSB showed the best growth rate for all strains (data not shown) and was the selected broth medium for pharmacodynamic simulations.

In vitro susceptibility

MICs of cefditoren, amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid were determined by the microdilution method following NCCLS/CLSI recommendations [21], and also using THSB as media (broth media used in pharmacodynamic simulations). MICs were determined in triplicate and the modal value of each determination was considered.

In vitro kinetic model (Figure 1)

A previously described two-compartment dynamic model was used to expose bacteria to changing study drug concentrations avoiding the dilution of the bacterial inoculum together with the drug [17,18]. The extra-capillary space and the intra-dialyser circulating tubing of

the second compartment (FX50 helixone dialyzer, Fresenius Medical Care S.A., Barcelona, Spain), represented the colonisation site. The central compartment, representing the systemic circulation, consisted of a spinner flask with THSB, tubing and lumina of capillaries within a dialyser unit. The exponential decay of concentrations was obtained by a continuous dilution-elimination process using computerized peristaltic pumps (Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA) set to simulate half-lives of amoxicillin, clavulanic acid and cefditoren. In control drug-free simulations the rate of peristaltic pumps was fixed to 0.67 ml/min. Additional pumps circulated the antimicrobial-medium mixture at 50 ml/min rate between the central and peripheral compartments, and at 25 ml/min within the extra-capillary space through external tubing. A computer-controlled syringe pump (402 Dilutor Dispenser; Gilson S.A, Villiers-le-Bel, France) allowed the simulation of drug concentrations by infusion of the drug into the central compartment until the maximum concentration achieved in serum (C_{max}) was reached. Both compartments were maintained at 37°C all over the simulation process.

Preparation of individual and mixed cultures

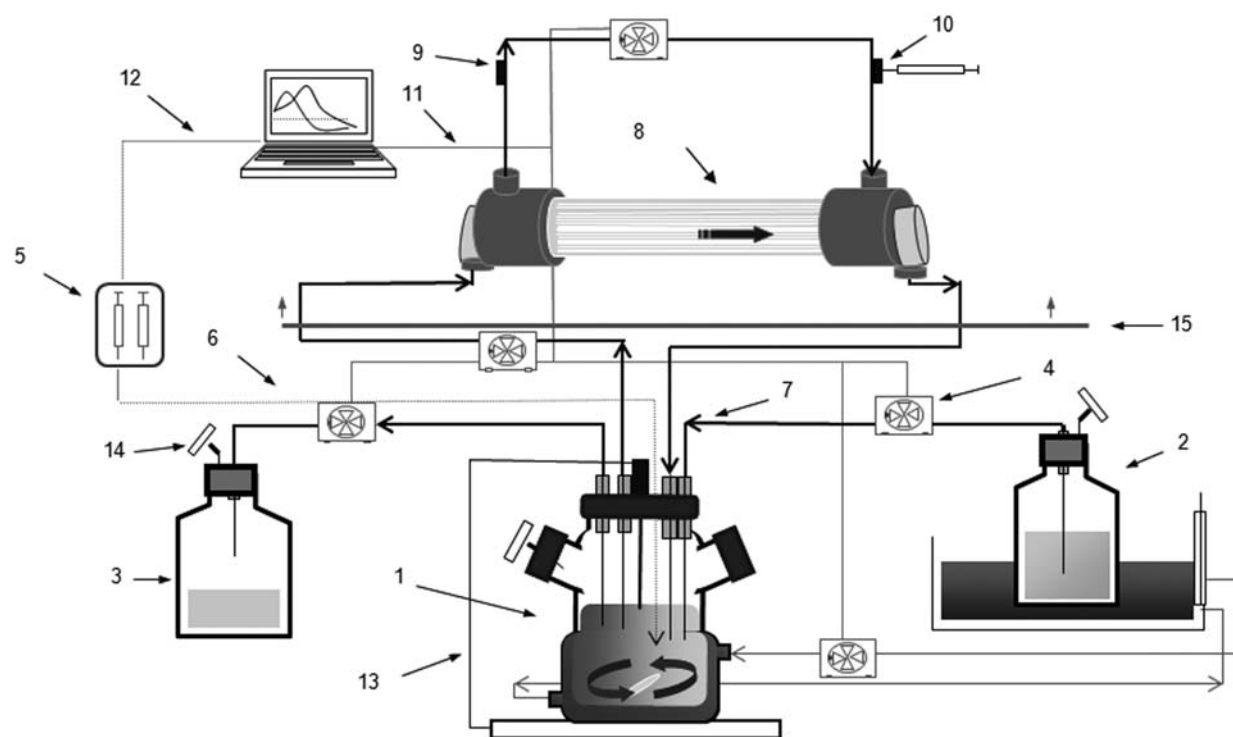
The strains were grown overnight on Mueller-Hinton agar (Difco laboratories) supplemented with 5% lysed sheep blood (Biomedics) (MHA) in the case of *S. pneumoniae* and *S. pyogenes*, or on GC agar (Difco laboratories) supplemented with 5% sheep blood (added at 50°C) and VX growth factors (GCSA) in the case of *H. influenzae*. Several colonies of each strain were suspended in THSB to obtain a bacterial density of approx. 1×10^8 cfu/ml. A 1:100 dilution was prepared to obtain an initial inoculum of approx. 1×10^6 cfu/ml. For the mixed inoculum, a mixture of identical 1:1:1:1 volumes of each bacterial suspension was prepared, yielding an inoculum of approx. 4×10^6 cfu/ml.

Experiments

Sixty ml of each individual or of the mixed inoculum were introduced into the peripheral compartment of the in vitro model and pre-incubated 1 h. Experiments performed were:

- Antibiotic-free simulations using each individual inoculum (individual growth control)
- Antibiotic-free simulations using the mixed inoculum (mixed growth control)
- Bacteria-free simulations with each antibiotic to set the pharmacokinetic profile of each study drug
- Simulations with each antibiotic using the mixed inoculum

In each experiment, samples (0.5 ml) from the peripheral compartment were collected at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h. Each sample was serially ten-fold diluted in 0.9% sodium chloride, and 20 µl plated for bacterial counting onto plates containing different media to allow species/strains differentiation: a) MHA: growth of *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* that were differentiated by their different hemolytical properties (beta for *S. pyogenes* and alpha for *S. pneumoniae*), b) GCSA: growth of both *H. influenzae* strains that were differentiated from the other species by their morphological properties, c) GCSA containing 4 µg/ml of trimethoprim: growth of BL⁺, not allowing the growth of the BLPACR strain. Colony counts of the BLPACR strain were calculated by the difference in colony counts between both GCSA plates. The total population was established as the accumulated colony counting of *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* on MHA and *H. influenzae* on GCSA medium. All plates were incubated at 37°C 5% CO₂ for 24 h. The limit of detection was 50 cfu/ml. All experiments were performed in triplicate.



1. Central compartment (spinner flask, tubing and lumen of capillary), 2. Fresh broth reservoir, 3. Elimination, 4. Peristaltic pumps, 5. Syringe pump, 6. PTFE tubing, 7. Silicone tubing, 8. Infection compartment (extracapillary space), 9. Inoculation port, 10. Sample port, 11. RS-232 connection, 12. GSI OC connection, 13. Temperature probe, 14. Air filter y 15. Incubator.

Figure 1. Pharmacodynamic computerized device. Diagram of the in vitro two-compartment computerized device used in the study.
doi:10.1371/journal.pone.0003846.g001

Kinetic simulations

Free-drug concentrations after oral amoxicillin 875 mg three-times daily, amoxicillin/clavulanic acid 875/125 mg three-times daily and cefditoren-pivoxil 400 mg twice daily administration, were simulated over 24 h using the reported protein binding of 18% for amoxicillin [22], 25% for clavulanic acid [22], and 88% for cefditoren [23]. The target total pharmacokinetic parameters were: $C_{max} = 11.6 \mu\text{g/ml}$ and $t_{1/2} = 1.15 \text{ h}$ for amoxicillin [22], $C_{max} = 2.20 \mu\text{g/ml}$ and $t_{1/2} = 1.15 \text{ h}$ for clavulanic acid [22], and $C_{max} = 4.5 \mu\text{g/ml}$ and $t_{1/2} = 1.55 \text{ h}$ for cefditoren [23]. Target free concentrations and pharmacokinetic parameters are shown in Table 1.

Pharmacokinetic analysis

For the measurement of simulated antimicrobial concentrations, aliquots (0.5 ml) were taken at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h and at the time corresponding to T_{max} , and stored at -50°C . To study the influence of bacteria on the pharmacokinetic profile, samples for measuring antibiotic concentrations were taken both in bacteria-free antibiotic simulations (carried out to set the model) and in experimental simulations with bacteria and antibiotic. Concentrations were determined by bioassay using *Morganella morganii* ATCC 8076H as indicator organism for cefditoren [24] (linear concentrations from 0.0035 to $4 \mu\text{g/ml}$; limit of detection = $0.0035 \mu\text{g/ml}$), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 for amoxicillin (linear concentrations from 0.03 to $1 \mu\text{g/ml}$; limit of detection = $0.06 \mu\text{g/ml}$), and *Klebsiella pneumoniae* NCTC 11228 for clavulanic acid concentrations [25] (linear concentrations from 0.06 to $4 \mu\text{g/ml}$; limit of detection = $0.12 \mu\text{g/ml}$). Plates were inoculated with an even lawn of the indicator organism and

incubated for 18–24 h at 37°C . Intra- and inter-day coefficients of variation were 2.54% and 2.25% for amoxicillin, 3.68% and 2.02% for clavulanic acid, and 1.97% and 1.97% for cefditoren, respectively, for an internal control concentration of $0.75 \mu\text{g/ml}$.

Antimicrobial concentrations were analysed by a non-compartmental approach using WinNonlin 5.2 Professional program (Pharsight, Mountainview, CA, USA). C_{max} and T_{max} were obtained directly from observed data and the area under the concentration-time curve (AUC) was calculated by the trapezoidal rule. The percentage of the dosing interval that the unbound fraction of drug concentrations exceed the MIC, $fT_{>MIC}$, was calculated by a non-compartmental approach for pharmacodynamic data using the model 220 of WinNonlin program.

Measurement of β-lactamase activity

β-lactamase activity was measured in antibiotic simulations with the mixed inocula at 0, T_{max} , 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h using a modification of a previously described method [26,27]. In brief, 0.025 ml of a $500 \mu\text{g/ml}$ solution of Nitrocefin were added to 225 μl of samples collected at sampling times for colony counting, and incubated for 30 min at 37°C . Afterwards, 0.75 ml of phosphate buffer 0.05 M was added and absorbance at 486 nm (A_{486}) was spectrophotometrically read, using broth without inoculum as baseline absorbance.

Statistical analysis

Unpaired t test or one-way ANOVA with Tukey post test was used to compare the concentrations measured and the pharmacokinetic parameters calculated in bacteria-free simulations vs.

Table 1. Pharmacokinetics.

Time (h)	Cefditoren 400 mg			Clavulanic acid 125 mg			Amoxicillin 875 mg				
	Target	S _{BF}	S _{MI}	Target	S _{BF}	S _{MI}	AMX simulations			AMC simulations	
							Target	S _{BF}	S _{MI}	S _{BF}	S _{MI}
T _{max} ^a	0.50	0.52±0.02	0.52±0.03	1.65	1.70±0.09	1.46±0.11	9.51	9.05±0.19	5.11±1.27 ^b	9.17±0.24	9.24±0.71
2	-	0.36±0.00	0.40±0.04	1.22	1.15±0.13	1.07±0.21	7.03	6.30±0.51	2.43±1.49 ^b	6.12±0.09	6.04±0.91
4	0.29	0.28±0.04	0.30±0.02	0.36	0.21±0.03	0.21±0.03	2.11	1.74±0.00	UDL ^b	1.50±0.17	0.59±0.39 ^b
6	0.12	0.12±0.01	0.10±0.03	0.11	0.13±0.00	0.11±0.00	0.63	0.45±0.03	UDL ^b	0.41±0.05	0.06±0.02 ^b
8	0.04	0.04±0.00	0.05±0.01	0.03	UDL	UDL	0.19	0.13±0.03	UDL ^b	0.17±0.02	0.04±0.01 ^b
10	0.02	0.02±0.00	0.01±0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{max} ^c	0.50	0.52±0.02	0.52±0.03	1.65	1.70±0.09	1.46±0.10	9.51	9.06±0.19	5.11±1.27 ^b	9.17±0.24	9.24±0.71
AUC ^d	1.79	1.76±0.05	1.79±0.10	3.91	3.26±0.09	2.86±0.40	22.59	20.13±0.52	5.61±1.71 ^b	19.76±0.91	15.90±1.59
t _{1/2} (h)	1.55	1.49±0.06	1.48±0.07	1.15	0.99±0.31	1.03±0.17	1.15	1.08±0.09	0.40±0.06 ^b	1.16±0.03	0.80±0.03 ^b

Free concentrations (in beta-phase over the dosing interval) and pharmacokinetic parameters: target values and values determined in bacteria-free simulations (S_{BF}) and in simulations with the mixed inocula (S_{MI}).

^aT_{max}: 2.8 h for cefditoren, 1.5 h for clavulanic acid and amoxicillin.

^bp<0.01 versus S_{BF}.

^cμg/ml.

^dmg×h/L.

UDL = under detection limit.

doi:10.1371/journal.pone.0003846.t001

simulations with the mixed inocula for each study drug, and of β-lactamase production between simulations with the different study drugs. A p≤0.01 was considered statistically significant.

Results

Pharmacokinetics

Table 1 shows concentrations and pharmacokinetic parameters experimentally measured in the peripheral compartment in bacteria-free simulations and in those simulations performed with the mixed inocula. For cefditoren and clavulanic acid, no significant differences were found between target free concentrations, those determined in bacteria-free simulations and those in mixed inocula simulations. In contrast, for amoxicillin significant differences were found between concentrations determined in simulations carried out with the mixed inocula and those measured in bacteria-free simulations. In amoxicillin simulations (where amoxicillin was not protected by clavulanic acid) significant lower concentrations of amoxicillin were found in simulations carried out with the mixed inocula from T_{max} to 8 h (end of the dosing interval), with non-detectable amoxicillin concentrations from 4 h on. This resulted in a significant decrease in amoxicillin pharmacokinetic parameters calculated with amoxicillin concentrations measured in simulations carried out with the mixed inocula (with its β-lactamase production) vs. those calculated with concentrations measured in bacteria-free simulations: C_{max} decreased from 9.06 to 5.11 μg/ml, AUC from 20.13 to 5.61 μg/ml×h, and t_{1/2} from 1.08 to 0.40 h. In amoxicillin/clavulanic acid simulations, regardless the presence of clavulanic acid, significant lower concentrations of amoxicillin were found in simulations carried out with the mixed inocula from 4 to 8 h, although differences in pharmacokinetic parameters were not significant except for the half-life value (1.16 vs. 0.80 h).

In vitro susceptibility

Table 2 shows in vitro susceptibility (MICs determined following CLSI recommendations) of study strains to the antibiotics used in

this study. MICs determined in THSB (the broth media used in the simulations) exhibited equal values to those determined in the media recommended by CLSI, except for the BLPACR strain and cefditoren, and the BL⁺ strain and amoxicillin/clavulanic acid where MICs in THSB showed one-dilution lower values. *S. pyogenes* was susceptible to all antibiotics with MICs ≤0.03 μg/ml. *S. pneumoniae* was susceptible to amoxicillin with or without clavulanic acid (MIC = 2 μg/ml), and although there are not established CLSI breakpoints for cefditoren, the strain would be classified as intermediate resistant (MIC = 0.25 μg/ml) following the FDA proposed breakpoints [23]. Both *H. influenzae* strains were inhibited by cefditoren concentrations of 0.06 μg/ml, were resistant to amoxicillin, and the BLPACR strain was also resistant to amoxicillin/clavulanic acid according to CLSI breakpoints [28].

Pharmacodynamics

Table 2 shows fT_{>MIC} calculated both with concentrations determined in bacteria-free simulations and in those with the mixed inocula. Similar values were obtained in both cases for cefditoren with fT_{>MIC} >55% for *H. influenzae* and *S. pyogenes*, and ≈25% for *S. pneumoniae*. In the case of amoxicillin/clavulanic acid, negligible values of amoxicillin fT_{>MIC} were obtained against the BLPACR strain, values for the BL⁺ and *S. pneumoniae* decreased from 40.8% to 32.8% when comparing bacteria-free vs. mixed inocula (with its β-lactamase production), and were nearly 100% of the dosing interval for *S. pyogenes*. Finally, in amoxicillin simulations, where clavulanic acid was not present to protect amoxicillin, negligible values were obtained for both β-lactamase producing strains, and fT_{>MIC} decreased when comparing bacteria-free vs. mixed inocula simulations from 43.2% to 17.7% (*S. pneumoniae*) and from 99.9% to 24.9% (*S. pyogenes*) in the case of the gram-positive strains.

Fitness in antibiotic-free simulations

Viability in THSB over time in individual and mixed simulations without antibiotics is shown in Figure 2. In individual cultures mean colony counts increased from time 0 to 12 and 24 h in ≥1 log₁₀ cfu/

Table 2. Pharmacodynamics.

	Cefditoren			Amoxicillin			Amoxicillin/clavulanic acid		
	MIC	T>MIC		MIC	T>MIC		MIC	T>MIC ^a	
		S _{BF}	S _{MI}		S _{BF}	S _{MI}		S _{BF}	S _{MI}
<i>S. pyogenes</i>	0.015	84.3	79.0	0.03	99.9	24.9	0.03	99.9	99.9
<i>S. pneumoniae</i>	0.25	24.0	25.6	2	43.2	17.7	2	40.8	32.8
<i>H. influenzae</i> BL ⁺	0.06	57.4	58.0	>16	0.0	0.0	2	40.8	32.8
<i>H. influenzae</i> BLPACR	0.06	57.4	58.0	>16	0.0	0.0	8	4.5	4.6

In vitro susceptibility (MIC; µg/ml) of the strains used in the study, and T>MIC (% dosing interval) in bacteria-free simulations (S_{BF}) and in simulations with the mixed inocula (S_{MI}) for bid 400 mg cefditoren, tid 875 mg amoxicillin, and tid 875/125 mg amoxicillin/clavulanic acid regimens.

^aon amoxicillin basis.

doi:10.1371/journal.pone.0003846.t002

ml for all strains except *S. pyogenes* where similar colony counts were found at times 0, 12 and 24 h (≈6.05 log₁₀ cfu/ml).

The situation was completely different in simulations with the mixed inocula. Mean log₁₀ colony counts of the global mixed inocula were maintained over time (6.55 log₁₀ at time 0, 6.37 log₁₀ at 12 h and 6.10 log₁₀ at 24 h), but the distribution of the bacterial population highly varied when considering the percentage of cfu/ml of each strain over 24 h. At time 0 each strain accounted for approx. 25% of the mixed inocula, and at 24 h up to 96.3% of the population corresponded to *S. pyogenes*, with small populations of the BLPACR strain (3.17%) and *S. pneumoniae* (0.50%), and colony counts below the detection limit for the BL⁺ strain.

Simulations with antibiotics and mixed inocula

A reduction of 98.5% (≈2 log₁₀ cfu/ml) in the initial global mixed inocula at 24 h was obtained with cefditoren, but no reductions were obtained with amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid.

The reduction provided by cefditoren was due to the disappearance of the *S. pyogenes* population at 6 h (fT_{>MIC} 79%), of *H. influenzae* populations at 12 h (with fT_{>MIC} 58%), and to 94% decrease in the initial *S. pneumoniae* population at 24 h (with fT_{>MIC} ≈25%).

In amoxicillin/clavulanic acid simulations the maintained counts of BL⁺ (fT_{>MIC} 32.8%), and the increase in 0.5 log₁₀ of the BLPACR population (fT_{>MIC} of only 4.6%) were responsible for the absence of reduction in the initial global mixed inocula. *S. pneumoniae* decreased 0.94 log₁₀ (fT_{>MIC} 32.8%) and *S. pyogenes* was not detectable from 10 h on (fT_{>MIC} 99.9%).

In amoxicillin simulations, the maintenance or slight increase in *H. influenzae* strains (fT_{>MIC} 0%) produced the absence of reductions in the initial global mixed inocula at 24 h. *S. pneumoniae* decreased only 0.49 log₁₀ and this could be related to the decrease in fT_{>MIC} from 43.2% in bacteria-free simulations to 17.7% in mixed inocula simulations due to β-lactamase production and amoxicillin inactivation as shown in Table 1 (significantly lower amoxicillin concentrations in mixed inocula vs. bacteria-free simulations). This inactivation also affected the activity against *S. pyogenes*, and the amoxicillin regimen was the only one that was not able to eradicate this strain (although producing 1.2 log₁₀ reduction), due to the reduction in fT_{>MIC} from 99.9% to 24.9% when comparing bacteria-free vs. mixed inocula simulations.

β-lactamase activity

Table 3 shows β-lactamase activity over 24 h in the simulations carried out with the study drugs. No differences were found

between the three antibiotic regimens until 6 h when differences between amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid simulations were significant. At 10 and 12 h significant higher β-lactamase activity was found in amoxicillin than in amoxicillin/clavulanic acid simulations, and this could be related with the different population of the β-lactamase producing strains found in both simulations at these timepoints: approx. 7.5 log₁₀ in amoxicillin and approx. 4–5 log₁₀ in amoxicillin/clavulanic acid simulations. In cefditoren simulations, at 10 h and 12 h, the β-lactamase activity determined was similar to the one in amoxicillin simulations. Cefditoren was highly active against the two *H. influenzae* strains, and the lysis of these organisms (colony counts ≤100 colonies at these timepoints) probably produced release of the enzyme responsible for the high β-lactamase activity determined.

At 24 h significantly lower β-lactamase activity (0.05 absorbance units) was found in cefditoren simulations (*H. influenzae* colony counts below the limit of detection) vs. amoxicillin with or without clavulanic acid (0.20 absorbance units, a value similar to time 0) simulations where colony counts were higher than the initial inocula.

Discussion

Ecology and resistance in human microbiota are related phenomena since there is some evidence that bacterial fitness decreases, at least at short term, due to resistance [29]. In compartment models the fitness of a bacterial strain is directly proportional to its ability to compete with other strains and inversely proportional to its clearance [30]. If there is heterogeneity in fitness, those strains with higher fitness are anticipated or eventually prevailed [30]. Dynamics of the different subpopulations in an antibiotic-free environment are the baseline that antibiotic treatments can alter by interfering with bacterial fitness (including colonisation and transmission), since resistance can be associated with a decrease in fitness [31].

In this study we tried to simulate a nasopharyngeal niche by means of a mixed inocula of common respiratory isolates showing classical (β-lactamase production in *H. influenzae* and penicillin resistance in *S. pneumoniae*) and emergent but increasing (concomitant *fliI* gene mutation in the BLPACR strain) resistance phenotypes. Despite up to 80% of healthy persons carry *H. influenzae* [4], with multiple strains in 50% positive samples [5] and although there is an increasing isolation rate of BLPACR [11], the use of strains with different resistance phenotypes may be a limitation of the study. However resistance was needed as a marker to show differences between the three antibiotics used with

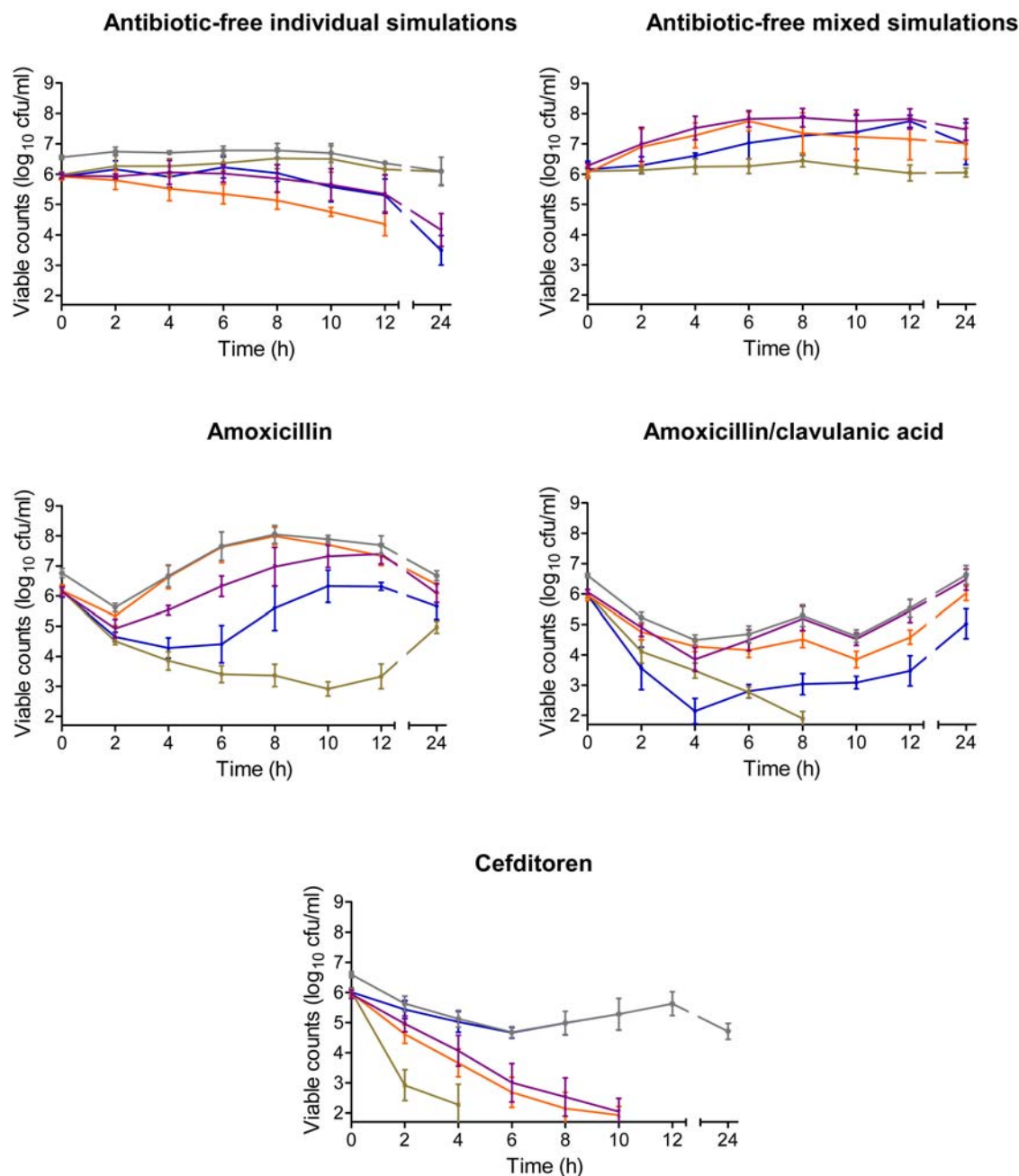


Figure 2. Evolution of inocula over time under experimental conditions. Colony counts over 24 h in antibiotic-free individual simulations, antibiotic-free mixed simulations and in simulations with study drugs (grey: total population, blue: *S. pneumoniae*, green: *S. pyogenes*, orange: BL⁺, purple: BLPACR).
doi:10.1371/journal.pone.0003846.g002

different behaviour (susceptibility, protection by an inhibitor or resistance) in the presence of β-lactamases. Another limitation of the study may be the exposition to antibiotics of mixed inocula with identical proportions of the different strains at time 0. In a pathological situation, the inoculum of *S. pyogenes* may be higher than that of the other microorganisms, as occurred in this study in antibiotic-free simulations: *S. pyogenes* was the dominant population at 24 h (accounting for 96.3%) together with a small population of β-lactamase producing *H. influenzae* strain (3.17%). β-lactamase producing bacteria are frequently found in patients with recurrent tonsillitis, where the exposure to antibiotics in general and to β-

lactams in particular select them in nasopharyngeal flora [14]. This has lead to the concept of co-pathogenicity (protection of *S. pyogenes* susceptible to penicillin by colocalized bacteria resistant to penicillin due to β-lactamase production) [32–34]. Co-pathogenicity has been hypothesised by some authors to be responsible of penicillin treatment failures in the treatment of group A β-hemolytic streptococci pharyngitis due to β-lactamase producing organisms in the pharynx as *H. influenzae* or *Moraxella catarrhalis* [34], but criticised by others [35,36] on the basis that if there is a clinical difference (that may be dubious) between penicillin and cephalosporins, the question of how important is this difference,

Table 3. β-lactamase activity.

Time	Cefditoren	Amoxicillin	Amoxicillin/clavulanic acid
0	0.21±0.00	0.21±0.00	0.24±0.00
Tmax	0.11±0.10	0.06±0.03	0.02±0.03
2	0.06±0.07	0.09±0.05	0.00±0.00
4	0.18±0.13	0.17±0.03	0.05±0.00
6	0.21±0.08	0.36±0.11	0.10±0.00 ^b
8	0.31±0.11	0.23±0.04	0.14±0.00
10	0.23±0.11	0.17±0.06	0.02±0.02 ^c
12	0.24±0.05	0.30±0.02	0.01±0.01 ^c
24	0.05±0.02 ^d	0.19±0.06	0.20±0.01

β-lactamase activity (absorbance units) in simulations of bid 400 mg cefditoren, tid 875 mg amoxicillin, and tid 875/125 mg amoxicillin/clavulanic acid regimens.

^aTmax: 2.8 h for cefditoren, 1.5 h for clavulanic acid and amoxicillin.

^bp<0.01 amoxicillin/clavulanic acid vs. amoxicillin.

^cp<0.01 amoxicillin/clavulanic acid vs. amoxicillin and cefditoren.

^dp<0.01 cefditoren vs. amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid.

doi:10.1371/journal.pone.0003846.t003

together with cost issues, remains. On the other side, in addition to the clinical goal of antimicrobial therapy that should be to eradicate the infecting pathogen, minimization of resistance selection in normal nasopharynx flora, and prevention of transmission of resistant clones from nasopharynx should also be taken into account.

Pharmacodynamic parameters as serum $fT_{>MIC}$ for β-lactams can be related to bacterial eradication at the infection site, and the subsequent therapeutic outcome together with prevention of resistance [37] also in normal flora. This study explores the effects of serum drug profiles over 24 h of different β-lactam regimens on the natural evolution of the simulated niche. Although it may be argued that serum concentrations do not resemble nasopharynx concentrations, free-drug concentrations were used as an approximation despite the fact that protein binding of the highly bound cephalosporin may not highly influence bacterial killing [38]. In addition, in order to know the effects of β-lactamase production on antibiotic pharmacokinetics and its consequences on pharmacodynamic parameters predicting antibacterial activity, pharmacokinetic parameters were determined with concentrations measured in bacterial mixed inocula simulations and in bacteria-free simulations. The presence of the β-lactamase did not alter the concentrations of cefditoren (TEM-1 β-lactamase resistant) but highly modified those of amoxicillin over the entire dosing interval in amoxicillin tid regimen simulations, and in a lesser extent (from 4 h on) in amoxicillin/clavulanic acid tid regimen simulations. This led to pharmacokinetic parameters of amoxicillin significantly lower in mixed inocula simulations, with $fT_{>MIC}$ values different if β-lactamase activity is considered or not.

As a result, the activity of cefditoren was not influenced by the presence of β-lactamase, and this cephalosporin eradicated *S. pyogenes* and co-pathogens as *H. influenzae*, and decreased *S. pneumoniae* population in 94%. In the case of the tid regimen of amoxicillin/clavulanic acid, the β-lactamase production by the

BLPACR strain (resistant to amoxicillin/clavulanic acid: $fT_{>MIC}$ of only 4.6%) protected the BL⁺ *H. influenzae* that although susceptible to amoxicillin/clavulanic acid (MIC = 2 μg/ml; $fT_{>MIC}$ 32.8%), was not eradicated or even diminished. The same occurred with *S. pneumoniae* (MIC = 2 μg/ml; $fT_{>MIC}$ 32.8%) that was only reduced in <1 log₁₀. However the presence of the β-lactamase did not avoid eradication of *S. pyogenes* (MIC = 0.03 μg/ml; $fT_{>MIC}$ 99.9%). On the contrary, in tid amoxicillin simulations, the maintenance and even increase in β-lactamase producing strains ($fT_{>MIC}$ 0%) were able to protect not only *S. pneumoniae* (because a decrease in $fT_{>MIC}$ from 43.2% to 17.7% in bacteria-free vs. mixed inocula simulations) but also *S. pyogenes* (decrease in $fT_{>MIC}$ from 99.9% to 24.9%) from eradication.

The bacteriological failure rates of penicillins increased from 2 to 10% in the early 70's, but beginning in the late 70's, penicillin bacteriological failure rates increased to 30% in 2000's [39], maybe as the prevalence of β-lactamase production increased. Despite different causes for treatment failure (lack of compliance, reexposure, eradication of pharyngeal flora, bacterial fitness), and contradictory reports on the effects of co-pathogenicity [39,40], the results of this study reinforces the concept of "indirect pathogen" since β-lactamase production in mixed inocula (resembling pharyngeal flora) decreased amoxicillin concentrations and pharmacokinetic parameters against *S. pneumoniae* or *S. pyogenes*, when clavulanic acid was not present, in such a magnitude that adequate values were not obtained and eradication was precluded. The presence of clavulanic acid along a tid regimen countered this effect of indirect pathogenicity by protecting amoxicillin from β-lactamase degradation, and a very susceptible strain as *S. pyogenes* was eradicated. However since the β-lactamase was produced by a strain resistant to amoxicillin/clavulanic acid (as the BLPACR strain), clavulanic acid was not able to protect amoxicillin from degradation in such an extent to allow its bactericidal activity against strains with MICs in the limit of susceptibility, as the *H. influenzae* BL⁺ and *S. pneumoniae* (MICs of 2 μg/ml) that were protected from eradication, thus selecting them. The quality of TEM β-lactamase resistance of cefditoren avoided this co-pathogenicity effect of *H. influenzae* β-lactamase production.

Although this study is only an approach of what could occur in the human nasopharynx, the results suggest that, at least in vitro, the presence of β-lactamase producing microorganisms may protect other microorganisms present in the niche. This effect of "indirect pathogen" or co-pathogenicity seems to be gradual since β-lactamase inhibitors (as clavulanic acid in tid regimens) countered it for strains very susceptible to amoxicillin as *S. pyogenes* but not for susceptible strains with amoxicillin MICs values in the limit of susceptibility as *S. pneumoniae*. These in vitro findings indicate a potential therapeutic advantage for β-lactamase resistant cephalosporins with high intrinsic activity against streptococci.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LA MJG. Performed the experiments: DS LA NG MT FC. Analyzed the data: DS LA LA MJG. Contributed reagents/materials/analysis tools: PC. Wrote the paper: LA MJG. Reviewed and approved the manuscript: JP.

References

1. Brook I, Gobar AE (2005) Recovery of potential pathogens and interfering bacteria in the nasopharynx of otitis media-prone children and their smoking and nonsmoking parents. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 131: 509–512.
2. Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Alves CR, Carriço JÁ, et al. (2008) High rates of transmission of and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* within a day care center revealed in a longitudinal study. J Clin Microbiol 46: 225–234.

3. Hammit LL, Bruden DL, Butler JC, Baggett HC, Hurlburt DA, et al. (2006) Indirect effect of conjugate vaccine on adult carriage of *Streptococcus pneumoniae*: an explanation of trends in invasive pneumococcal disease. *J Infect Dis* 193: 1487–1494.
4. Murthy TF (2005) *Haemophilus influenzae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett principles and practice of infectious diseases*, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. pp 2661–2669.
5. Smith-Vaughan HC, Leach AJ, Shelby-James TM, Kemp K, Kemp DJ, et al. (1996) Carriage of multiple ribotypes of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* in aboriginal infants with otitis media. *Epidemiol Infect* 116: 177–183.
6. Musher DM (2005) *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett principles and practice of infectious diseases*, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. pp 2392–2411.
7. Sá-Leão R, Tomasz A, Santos Sanches I, de Lencastre H (2002) Pilot study of the genetic diversity of the pneumococcal nasopharyngeal flora among children attending day care centers. *J Clin Microbiol* 40: 3577–3585.
8. Ekdahl K, Ahlinder I, Hansson HB, Melander E, Mölsted S, et al. (1997) Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experiences from the South Swedish Pneumococcal Intervention Project. *Clin Infect Dis* 25: 1113–1117.
9. Melegaro A, Choi Y, Pebody R, Gay N (2007) Pneumococcal carriage in United Kingdom families: estimating serotype-specific transmission parameters from longitudinal data. *Am J Epidemiol* 166: 228–235.
10. Pérez-Trallero E, García-de-la-Fuente C, García-Rey C, Baquero F, Aguilar L, et al. (2005) Geographical and ecological analysis of resistance, co-resistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1965–1972.
11. García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, et al. (2007) Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2564–2573.
12. Bisno AL, Stevens D (2005) *Streptococcus pyogenes*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett principles and practice of infectious diseases*, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. pp 2362–2379.
13. Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER (2004) Group A streptococci among school-aged children: clinical characteristics and the carrier state. *Pediatrics* 114: 1212–1219.
14. Brook I (2001) The role of beta-lactamase producing bacteria and bacterial interference in streptococcal tonsillitis. *Int J Antimicrob Agents* 17: 439–442.
15. Brook I, Gober AE (2006) Recovery of interfering and beta-lactamase-producing bacteria from group A beta-haemolytic streptococci carriers and non-carriers. *J Med Microbiol* 55: 1741–1744.
16. Baquero F (2005) Evolution and the nature of time. *Int Microbiol* 8: 81–91.
17. Cafini F, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Alou L, et al. (2008) Decrease in bacterial load versus resistance selection of pneumococcal subpopulations by β-lactam physiological concentrations over time: An in vitro pharmacodynamic simulation. *Microbial Drug Res* 14: 13–21.
18. Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, Echeverría O, et al. (2006) Effects of antimicrobials on the competitive growth of *Streptococcus pneumoniae*: a pharmacodynamic in vitro model approach to selection of resistant populations. *J Antimicrob Chemother* 58: 794–801.
19. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, et al. (2002) Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2208–2218.
20. Scrivner SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Brunton J, et al. (1994) Determination of susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their β-lactamases. *Antimicrob Agents of Chemother* 38: 1678–1680.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*—Sixth Edition: Approved Standard M7-A6. Wayne, PA, USA: NCCLS.
22. Augmentin package insert. www.fda.gov.
23. Cefditoren package insert. www.fda.gov.
24. Torrico M, Aguilar L, González N, Giménez MJ, Echeverría O, et al. (2007) Influence of TEM-1 beta-lactamase on the pharmacodynamic activity of simulated total versus free-drug serum concentrations of cefditoren (400 milligrams) versus amoxicillin-clavulanic acid (2,000/125 milligrams) against *Haemophilus influenzae* strains exhibiting an N526K mutation in the *β*l gene. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3699–3706.
25. Andrews JM (1999) Microbiological assays. In: Reeves DS, Wise R, Andrews JM, White LO, eds. *Clinical Antimicrobial Assays*, 1st edn. Oxford: Oxford University Press. pp 35–44.
26. Martín M, Aguilar L, Balcabao IP, Gómez-Lus ML, Dal-Ré R, et al. (1997) In-vitro pharmacodynamic simulation of clavulanic acid concentrations: effect on *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* beta-lactamase activity. *J Antimicrob Chemother* 39: 290–292.
27. Prieto J, Aguilar L, Giménez MJ, Toro D, Gómez-Lus ML, et al. (1998) In vitro activities of co-amoxiclav at concentrations achieved in human serum against the resistant subpopulation of heteroresistant *Staphylococcus aureus*: a controlled study with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1574–1577.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement*, M100-S17. Wayne, PA, USA: CLSI.
29. Gillespie SH, Voelker LL, Dickens A (2002) Evolutionary barriers to quinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 8: 79–84.
30. Rozen DE, McGee L, Levin BR, Klugman KP (2007) Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 412–416.
31. Nuermberger EL, Bishai WR (2004) Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*: what does the future hold? *Clin Infect Dis* 38 Suppl 4: S363–371.
32. Brook I, Foote PA (2005) Efficacy of penicillin versus cefdinir in eradication of group A streptococci and tonsillar flora. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4787–4788.
33. Brook I, Gober AE (2006) Increased recovery of *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* in association with group A beta-haemolytic streptococci in healthy children and those with pharyngo-tonsillitis. *J Med Microbiol* 55: 989–992.
34. Casey JR, Pichichero ME (2007) The evidence base for cephalosporin superiority over penicillin in streptococcal pharyngitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57(3 Suppl): S39–45.
35. Bisno AL (2004) Are cephalosporins superior to penicillin for treatment of acute streptococcal pharyngitis? *Clin Infect Dis* 38: 1535–1537.
36. Shulman ST, Gerber MA (2004) So what's wrong with penicillin for strep throat? *Pediatrics* 113: 1816–1819.
37. Ball P, Baquero F, Cars O, File T, Garau J, et al. (2002) Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. *J Antimicrob Chemother* 49: 31–40.
38. Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, González N, et al. (2008) High protein binding and cidal activity against penicillin-resistant *S. pneumoniae*: a cefditoren in vitro pharmacodynamic simulation. *PLoS ONE* 3: e2717.
39. Pichichero ME, Casey JR, Mayes T, Francis AB, Marsocci SM, et al. (2000) Penicillin failure in streptococcal tonsillopharyngitis: causes and remedies. *Pediatr Infect Dis J* 19: 917–923.
40. Stjernquist-Desatnik A, Holst E (1999) Tonsillar microbial flora: comparison of recurrent tonsillitis and normal tonsils. *Acta Otolaryngol* 119: 102–106.